



Université de Montpellier II, Sciences et Techniques du Languedoc

Thèse

Pour obtenir le grade de

Docteur de l'Université de Montpellier II

Discipline : Virologie

Ecole doctorale : Sciences chimiques et biologiques pour la santé

Présentée et soutenue publiquement par

Ramzi Bargaoui

Épidémiologie de la fièvre West Nile en Tunisie

le 18 décembre 2012

Composition du jury

Dr F. Rachdi	Centre National de la Recherche Scientifique	Président
Dr T. Lefrancois	UMR 15, CIRAD	Directeur
Dr S. Zientara	UMR 1161 ANSES-INRA-ENVA Virologie	Rapporteur
Pr N. Ben Chehida	Ecole Nationale de Médecine Vétérinaire de Tunisie	Rapporteur
Dr R. Lancelot	UMR 15, CIRAD	Examineur
Dr S. Lecollinet	UMR 1161 ANSES-INRA-ENVA Virologie	Examineur

REMERCIEMENTS

À Monsieur le Docteur **Férid Rachdi**, Directeur de recherche au Centre National de la Recherche Scientifique qui nous a fait l'honneur d'accepter la présidence de notre jury de thèse,

Hommage respectueux.

À Monsieur le Docteur **Thierry Lefrançois** Directeur UMR 15, au CIRAD qui nous a fait l'honneur d'accepter de diriger ce travail, qu'il soit assuré de notre vive reconnaissance.

À Monsieur le Docteur **Renaud Lancelot** Directeur adjoint de UMR 15, au CIRAD qui a accepté d'encadrer ce travail, qu'il trouve ici l'expression de notre reconnaissance profonde et de mes sincères remerciements et qu'il soit assuré de notre vive reconnaissance.

À Mademoiselle le Docteur **Sylvie Lecollinet** de UMR 1161 ANSES-INRA-ENVA Virologie. Qu'elle trouve ici l'expression de ma reconnaissance profonde et de mes sincères remerciements.

À Monsieur le Docteur **Stéphan Zientara** Directeur de UMR 1161 ANSES-INRA-ENVA Virologie, qui nous a fait l'honneur d'accepter d'être rapporteur de ce travail de thèse.

Mes hommages respectueux.

À Monsieur le Professeur **Nouredine Ben Chehida** Directeur général de l'Institut de la Recherche Vétérinaire de Tunisie, qui nous a fait l'honneur d'accepter d'être rapporteur de ce travail de thèse.

Mes hommages respectueux.

Je tiens à remercier Monsieur le Docteur **Dominique Martinez** qui m'a accueilli dans son unité avec beaucoup de gentillesse et de confiance. Veuillez trouver dans ce travail l'expression de mes sincères remerciements.

À mon père Mustapha, ma mère Salha, mon frère et mes sœurs en témoignage de toute mon affection, de ma reconnaissance, et tout particulièrement pour leur patience exemplaire.

A Adam et Iyad mes deux enfants, je voudrais leur dire que malgré mon absence j'ai toujours été avec eux, et que ce travail est pour eux... Je les embrasse très fort et je veux leur dire que je les aime...

À Bochra, ma très belle femme combattante, tu as toujours été patiente et tolérante vis-à-vis de mon absence. Je t'en suis fort reconnaissant. Tu seras toujours à mes côtés pour le meilleur et pour le pire.

Mes sincères remerciements s'adressent à tous les vétérinaires et les chauffeurs qui m'ont aidé à réaliser ce travail.

Je vous remercie,

Titre : Epidémiologie de la fièvre West Nile en Tunisie

Résumé

Nous avons cherché à mieux comprendre la situation épidémiologique du virus West Nile (VWN) en Tunisie. Nous avons tout d'abord produit une carte du risque de transmission du VWN aux équidés montrant un risque élevé dans de nombreuses régions, dépendant de facteurs environnementaux : zones humides et climat favorables aux populations d'oiseaux sauvages et de moustiques. Le taux élevé de séroprévalence observé chez les équidés est compatible avec l'hypothèse d'une circulation endémique du VWN sans exclure la possibilité d'introductions répétées.

Une étude complémentaire a démontré l'exposition des oiseaux domestiques, péri-domestiques et sauvages au VWN et a permis d'établir un premier inventaire des espèces d'oiseaux les plus exposées, pouvant servir de base à un système de surveillance de l'avifaune sauvage en Tunisie.

Le suivi sérologique mensuel de poules sentinelles a permis de détecter la circulation du virus en fin de saison chaude (septembre, octobre) à proximité de zones humides pendant une période de forte activité des moustiques et d'abondance des oiseaux sauvages. L'occurrence simultanée de cas humains de fièvre West Nile (FWN) laisse penser qu'un système de poules sentinelles serait utile pour une alerte précoce de recrudescence de l'activité du VWN.

A l'issue de ce travail, nous proposons des pistes pour un système de surveillance multidisciplinaire de la FWN, adapté au contexte tunisien, et devant permettre la détection précoce de toute circulation virale.

Mots clé : virus West Nile - Flavivirus - virologie – épidémiologie - surveillance –Tunisie

Discipline : Biologie

Laboratoires de thèse :

CIRAD - UMR 15 CMAEE, INRA, UMR1309 "Contrôle des Maladies Animales Exotiques et Emergentes" (Montpellier)

ANSES – UMR Virologie (Maisons-Alfort)

Title: Epidemiology of West Nile fever in Tunisia

Abstract

Our investigations aimed at clarifying some aspects of the West Nile virus (WNV) epidemiological situation in Tunisia, and in particular at identifying areas at high risk of WNV circulation. A major achievement was the establishment of a risk map for the transmission of WNF in horses. This map shows that the risk of transmission strongly depends on environmental factors: increased risk associated to wetlands proximity and climatic factors favourable to wild birds and mosquitoes. The high seroprevalence observed in horses is compatible with an endemic circulation of WNV without excluding the possibility of repeated introductions.

Another study in birds showed the exposure of domestic, wild resident and migratory birds to WNV, and helped establishing an initial inventory of bird species most exposed to WNV. These studies can serve as a basis for a monitoring system of wild birds in Tunisia.

A system of monthly follow-up of sentinel chickens detected virus circulation at the end of the hot season (September, October), near wetlands and during a period of high mosquito activity, and abundance of wild birds. The simultaneous occurrence of human cases of WNF brought us to suggest that active surveillance in sentinel chickens would be useful for early warning of increased activity of WNV. This work allows us to propose trails for a WNV multidisciplinary monitoring system adapted to the Tunisian situation, enabling early detection of viral circulation.

Keywords: West Nile virus – *Flavivirus* – virology – epidemiology – disease surveillance - Tunisia

Discipline: Biology

PhD laboratories:

CIRAD - UMR 15 CMAEE, INRA, UMR 1309 "Contrôle des Maladies Animales Exotiques et Emergentes" (Montpellier)

ANSES - UMR Virologie INRA, ANSES, ENVA (Maisons-Alfort)

Ce travail a été financé par une bourse Averroès de la Commission Européenne, et un projet CMCU du Ministère français des affaires étrangères et européennes



Sommaire

Introduction	1
Chapitre1 : état des connaissances sur la fièvre West Nile.....	5
1 Le virus West Nile	6
1.1 Taxonomie et structure	6
1.2 Cycle de multiplication	9
1.2.1 Adsorption, pénétration et décapsidation	9
1.2.2 Transcription et répllication du génome viral.....	9
1.2.3 Morphogenèse et libération des virions	10
1.3 Pouvoir pathogène	11
1.4 Pouvoir immunogène.....	12
1.5 Répartition géographique	14
2 Lignages et souches : phylogéographie.....	14
3 Le cycle de transmission du virus West Nile.....	23
3.1 Le cycle enzootique	25
3.1.1 Les vecteurs	25
3.1.2 Les hôtes vertébrés du virus West Nile.....	31
4 Facteurs écologiques.....	41
4.1 Classification des zones humides de Tunisie.....	43
4.2 Les sites Ramsar en Tunisie.....	44
4.3 Les facteurs anthropiques menaçant les zones humides	45
4.4 Facteurs écologiques et activité du virus West Nile.....	46
4.5 Distribution des vecteurs potentiels du virus West Nile selon les facteurs écologiques	47
5 Infection de l'homme et des équidés	48

5.1	L'infection humaine par le virus West Nile	48
5.2	Les infections humaines par le virus West Nile en Tunisie	51
5.3	Infection des équidés par le virus West Nile.....	55
5.4	Données générales sur les équidés en Tunisie	58
5.5	L'infection à virus West Nile chez les mammifères en Tunisie	58
Chapitre 2. Mapping the serological prevalence rate of West Nile fever in equids, Tunisia.....		61
1	Materials and Methods	65
1.1	Survey design	65
1.2	Laboratory procedures.....	66
1.3	Data set.....	67
1.4	Statistical analysis	68
2	Results	71
2.1	Discussion	78
Chapitre 3. Compréhension de l'histoire naturelle du virus West Nile en Tunisie		84
1	Incidence sérologique de la fièvre West Nile chez des poulets sentinelles .	85
1.1	Matériel et méthodes	85
1.2	Résultats	92
1.3	Discussion	95
1.4	Conclusion.....	100
2	Enquête sérologique sur l'avifaune sauvage et domestique	101
2.1	Matériel et méthodes	101
2.2	Résultats	103
2.3	Discussion	104
2.4	Conclusion.....	108

Chapitre 4. Investigations sur les encéphalites équine d'étiologie non rabique en Tunisie.....	109
1 Matériel et méthodes	111
2 Résultats	117
3 Discussion	117
Chapitre 5. Discussion générale : le contrôle de la fièvre West Nile en Tunisie....	120
1 Réseau national de surveillance de la fièvre West Nile	121
2 Comment améliorer la surveillance de la fièvre West Nile en Tunisie ?.....	123
2.1 Objectifs	123
2.2 Méthodes et outils	124
2.2.1 Alerte environnementale.....	124
2.2.2 Surveillance ciblée dans les zones à haut risque de transmission.....	125
2.2.3 Surveillance syndromique.....	129
3 Comment prévenir la fièvre West Nile en Tunisie ?	131
3.1 Vaccination des chevaux dans les zones à haut risque	131
3.2 Diminution du contact entre hôtes et vecteurs.....	133
3.2.1 Mesures de protection individuelle	133
3.2.2 Lutte anti-vectorielle	134
3.3 Stratégie opérationnelle	135
Références bibliographiques	139

Liste des tableaux

Tableau 2. Espèces d'oiseaux sauvages chez lesquelles le virus West Nile a été mis en évidence en Europe [Angelini et, Calistri et al, Hubalek, , Monaco et al, Valiakos et]	36
Tableau 3. Distribution des zones humides en Tunisie [El Ghoul,]	44
Tableau 4. Recensement des cas humains de fièvre West Nile en Europe et en Tunisie ($n = 775$) en 2012 (04/10/2012). Source : European Centre for Disease Prevention and Control	50
Tableau 5. Recensement des cas équins de fièvre West Nile survenus en 2010 en Europe et en Afrique du Nord	56
Tableau 6. Ninety per cent confidence set of 10 binomial logistic regression models of West Nile serological prevalence rate in Tunisia (1,189 sera, 74 imadas), selected according to QAICc.	74
Tableau 7. Relative importance of explanatory variables according to the 90% confidence set of 10 binomial logistic regression models of West Nile serological prevalence rate in Tunisia (1,189 sera, 74 imadas), selected according QAICc.	74
Tableau 8. Model coefficients and 95% confidence intervals (CI) averaged over a set of 10 binomial logistic regression models (table 2) of West Nile serological prevalence rate in Tunisia (1,189 sera, 74 imadas), selected according QAICc.	76
Tableau 9: Procédure de validation de l'amplification virale	89
Tableau 10: Interprétation des résultats de RT-PCR pour le virus West Nile	90
Tableau 11. Taux de séroprévalence des anticorps dirigés contre le virus West Nile observée chez les oiseaux migrants en Tunisie	104
Tableau 12. Taux de séroprévalence observée des anticorps dirigés contre le virus West Nile chez les oiseaux domestiques et péri-domestiques en Tunisie	104
Tableau 13 : Prélèvements de cerveaux d'équidés reçus au laboratoire de la rage à l'Institut Pasteur de Tunis	112
Tableau 14. Nombre de prélèvements d'encéphalite équine par région	112
Tableau 15. Volumes de réactifs de PCR utilisés par tube	115
Tableau 16. Vecteurs potentiels du virus West Nile sur le littoral méditerranéen français [Balenghien et al., Hannoun et al, Vermeil C., 1960]	126
Tableau 17. Vaccins contre le virus West Nile disponibles chez les chevaux.	132

Tableau 18. Vaccinations annuelles contre le virus West Nile chez les chevaux dans quelques pays infectés.....	132
---	-----

Liste des figures

Figure 1. Structure du virus West Nile [Zhang et al]	6
Figure 2. Organisation du génome viral du virus West Nile [Lecollinet,].....	7
Figure 3. Cycle de multiplication du virus West Nile [Stadler et al]	10
Figure 4. Cinétique d'apparition des anticorps après infection par le virus West Nile [Lecollinet,].....	13
Figure 5. Arbre phylogénétique du virus West Nile, établi à partir du séquençage du génom complet des souches virales.	15
Figure 6. Répartition géographique des virus West Nile de lignages 1 et 2.....	16
Figure 7. Arbre phylogénétique des virus West Nile basé sur le séquençage complet du génom viral et montrant les groupes 1a et 1b (lignage 1) et le lignage 2 [Jourdain et al].....	17
Figure 8. Arbre phylogénétique des virus West Nile basé sur une région de 254 paires de bases du gène de la glycoprotéine d'enveloppe E et montrant les virus de lignage 2 [Murgue et al].....	20
Figure 9. Dynamique hypothétique de diffusion temporelle et spatiale du virus West Nile du clade 1a d'après les données phylogéographiques [Zehender et al].....	23
Figure 10 : Représentation schématique de l'épidémiologie du virus West Nile.....	25
Figure 11. Voies de migration des oiseaux entre Afrique, Europe et Asie	37
Figure 12. Arbre phylogénétique base sur la séquence complète de différents virus West Nile. EQ = souche équine, H = souche humaine, M = souche isolée sur moustique, B = souche isolée sur oiseau [Jourdain et al]	38
Figure 13. les vois de migration des oiseaux en Tunisie.....	39
Figure 14. Principales concentrations d'oiseaux d'eau du recensement de janvier 2009 [Azafzaf et Feltrup-azafzaf]	40
Figure 15. Etages climatiques de la Tunisie [Paute,].....	42
Figure 16. Les zones humides et les sites Ramsar de Tunisie [Paute,].....	45
Figure 17. Distribution des cas d'infection par le virus West Nile en 2012 (25/10/2012) dans le bassin méditerranéen et en Europe. Source : European Centre for Disease Prevention and Control	50
Figure 18. Population tunisienne par gouvernorat [Harre,]	52
Figure 19. Taux d'attaque des cas de méningo-encéphalite humaine à virus West Nile pendant l'épidémie de 1997 dans le gouvernorat de Mahdia [Kouzana,]	53

Figure 20. Taux d'incidence pour 100.000 habitants des cas de méningo-encéphalite à virus West Nile en Tunisie pendant l'épidémie de 1997 [Triki et al].....	54
Figure 21. Observed serological prevalence rate of antibodies against West Nile virus in equids aggregated at the governorate level, Tunisia, 2009 (1,189 equids sampled in 74 imadas). Survey locations are shown as white points. The scale bar on the right is a color code for the serological prevalence rate. No data were available for governates in grey.	72
Figure 22. Prediction of West Nile serological prevalence rate in equids, 2009, Tunisia (a) predicted probability, (b) standard error of predicted probability. Estimates were obtained with a set of 10 binomial logistic regression models of West Nile serological prevalence rate in Tunisian equids, selected according to QAICc. The scale bar on the right of each plot is a color code for the serological prevalence rate (a) or its standard error (b).	78
Figure 23. Localisation des poulaillers sentinelles implantés en Tunisie (points bleus). Le fond de carte est la probabilité de prévalence sérologique chez les chevaux prédite par inférence multi-modèle en fonction de variables environnementales. L'échelle colorée à la droite du graphe donne la valeur des probabilités correspondant à la couleur.	86
Figure 24. Schéma de procédure du diagnostic de la fièvre West Nile chez les poules sentinelles	87
Figure 25. Exemple B : échantillon positif pour le virus West Nile sans contrôle interne	89
Figure 26. Exemple A : échantillon négatif pour le virus West Nile.....	90
Figure 27. Exemple B : échantillon positif pour le virus West Nile sans contrôle interne	91
Figure 28. Exemple C : échantillon positif pour le virus West Nile avec contrôle interne	91
Figure 29. Exemple D : échantillon inhibé pour le détection du virus West Nile	92
Figure 30. Période de suivi et effectif des poulaillers sentinelles pour l'étude de la transmission du virus West Nile en Tunisie. Les trois périodes grisées représentent les périodes estivales et automnales (août à décembre) pendant lesquelles des séroconversions ont été observées.....	93
Figure 31. Taux d'incidence sérologique de la fièvre West Nile et intervalle de confiance à 95% observés en période estivo-automnale dans les poulaillers sentinelles en	

Tunisie. Le taux d'incidence est représenté par un point bleu ou rouge, et l'intervalle de confiance à 95% pas un segment bleu ou rouge. La couleur rouge a été utilisée pour représenter les taux d'incidence > 0.....	94
Figure 32. Sites d'étude de la fièvre West Nile chez les oiseaux domestiques et sauvages de Tunisie. Le fond de carte est la probabilité de prévalence sérologique chez les chevaux prédite par inférence multi-modèle en fonction de variables environnementales. L'échelle colorée à la droite du graphe donne la valeur des probabilités correspondant à la couleur.....	101
Figure 33 Localisation des prélèvements analysés pour West Nile en Tunisie (points bleus). Le fond de carte est la probabilité de prévalence sérologique chez les chevaux prédite par inférence multi-modèle en fonction de variables environnementales. L'échelle colorée à la droite du graphe donne la valeur des probabilités correspondant à la couleur.....	113
Figure 34. Les produits de RT-PCR issus des échantillons prélevés sur des chevaux atteints d'encéphalite ont été analysés par électrophorèse sur un gel d'agarose. Un marqueur d'ADN de 100 bp a été utilisé. TN : témoin négatif, TP : témoin positif E1-E7 : échantillons de 1 à 7.....	117
Figure 35. Organisation et partenaires du réseau de surveillance de la fièvre West Nile en Tunisie.....	121

Introduction

L'épidémiosurveillance répond au besoin de connaissance en temps réel ou quasi-réel de la situation épidémiologique des maladies humaines, animales ou végétales contre lesquelles des mesures de contrôle sont entreprises, et de projection de leur évolution dans l'espace et dans le temps. Il s'agit d'une « méthode fondée sur des enregistrements en continu permettant de suivre l'état de santé ou les facteurs de risque d'une population définie, en particulier de déceler l'apparition de processus pathologiques et d'en étudier le développement dans le temps et dans l'espace, en vue de l'adoption de mesures appropriées de lutte » [Toma et al., 2001].

L'épidémiosurveillance est une activité essentielle des Services Vétérinaires au sens de l'Organisation Mondiale de la Santé Animale (OIE), c'est-à-dire l'ensemble des parties prenantes intervenant dans le domaine de la santé animale et des zoonoses.

Depuis le début du 20ème siècle, les maladies causées par des agents pathogènes transmis par des vecteurs, dites maladies vectorielles, comme le paludisme, la dengue ou la fièvre West Nile (FWN), ont été responsables de plus de morts chez les humains que toutes les autres causes de mortalité confondues [Kalluri et al., 2007]. Les agents pathogènes à transmission vectorielle, via les moustiques en particulier, sont parmi les causes principales de maladie et de décès dans le monde. Le vecteur est défini par l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) comme « un arthropode hématophage, qui assure la survie, la transformation, parfois la multiplication et la transmission d'un agent pathogène infectieux ou parasitaire ». Un vecteur n'est pas un simple « transporteur » d'agent pathogène. Il s'infecte en prélevant cet agent infectieux sur un hôte au cours d'un repas de sang. A l'issue d'une période de développement extrinsèque au cours de laquelle l'agent pathogène se réplique et infecte les organes du vecteur, celui-ci le transmet à un nouvel hôte vertébré lors d'un nouveau repas sanguin.

En médecine vétérinaire, les maladies vectorielles prennent une place de plus en plus grande dans l'actualité sanitaire, du fait notamment des changements écologiques tels le réchauffement climatique ou la modification des écosystèmes. En effet, ces maladies sont particulièrement sensibles aux changements écologiques susceptibles de modifier l'aire de répartition de certains pathogènes et/ou vecteurs et de favoriser la propagation de la maladie. C'est le cas, par exemple, de l'émergence récente de la fièvre catarrhale

ovine dans le bassin méditerranéen [Purse et al., 2005] ou de la FWN aux Etats-Unis [Glaser, 2004], en Europe [Hubálek et Halouzka, 1999] et dans le bassin méditerranéen[Sotelo et al., 2011].

La large dispersion géographique de la FWN dans le bassin méditerranéen, en Europe centrale et en Amérique du nord, avec plusieurs épidémies d'encéphalites humaines et équine mortelles, impose la mise en place d'une surveillance épidémiologique de cette maladie là où elle est présente ou risque de s'établir.

Découvert en Ouganda en 1937, le virus West Nile (VWN) (famille des Flaviviridae, genre *Flavivirus*, séro groupe de l'encéphalite japonaise) était largement répandu en Afrique, en Europe et en Asie avant son introduction en 1999 sur le continent nord-américain. Les modalités de son introduction sur ce continent sont inconnues mais l'hypothèse d'une origine anthropique, par exemple par importation d'oiseaux infectés, semble la plus plausible [Rappole et Hubálek, 2003]. Jusqu'au début des années 1990, le VWN était considéré comme peu pathogène pour l'homme. Plusieurs épidémies avaient été décrites comme bénignes, avec de rares cas graves de méningo-encéphalite. Cependant, à cette période, des épidémies humaines importantes, caractérisées par la survenue de nombreux cas graves avec atteintes neurologiques mortelles, en particulier chez les personnes âgées, ont eu lieu dans plusieurs pays, en Roumanie, en Russie, en Israël, en Tunisie, en Grèce, en Italie (2008-2010), en Hongrie (2008-2010) et en Espagne(2010).

Illustrant ses capacités d'adaptation à différentes espèces d'oiseaux et de vecteurs, le VWN est présent dans toute l'Afrique subsaharienne, à Madagascar, dans le bassin méditerranéen (Maghreb, Proche-Orient, Europe du Sud), en Europe et en Asie Mineure jusqu'en Inde, et sur les deux continents américains [Randolph et Rogers, 2010]. Comparé à d'autres *Flavivirus*, il est celui dont la distribution géographique est la plus large. Son cycle de transmission fait intervenir les moustiques (Diptera, Culicidae) comme vecteurs, essentiellement ceux du genre *Culex*, et les oiseaux en tant qu'hôtes vertébrés réservoirs et amplificateurs du virus. L'homme, les équidés ainsi que d'autres mammifères sont considérés comme des culs de sacs épidémiologiques (leur virémie est trop faible pour infecter des moustiques indemnes). La présence d'anticorps spécifiques chez des vertébrés très variés, incluant des mammifères, des amphibiens et des reptiles,

indique toutefois que ce virus a la faculté d'infecter une grande diversité d'hôtes au plan zoologique.

Depuis 1970, des tests sérologiques ont révélé la présence du VWN en Tunisie chez des enfants originaires de l'île de Djerba [Hachfi et al., 2010]. En 1997, le VWN a été responsable d'une première épidémie de méningo-encéphalite humaine en Tunisie avec un total de 173 cas enregistrés, dont 8 décès [Triki et al., 2001]. À la fin de l'été 2003, une deuxième flambée de cas de méningo-encéphalite à VWN a été enregistrée dans les mêmes gouvernorats côtiers, avec une extension géographique plus importante vers le sud, impliquant 21 patients souffrant de graves signes neurologiques dont 3 cas mortels. Durant ces deux épidémies, aucun cas clinique n'a été rapporté chez les équidés ni chez les oiseaux.

Dans la plupart des régions de Tunisie non touchées par ces deux épidémies, les conditions (climat, étendue des zones humides, abondance d'oiseaux migrateurs et de vecteurs potentiels) sont propices à l'apparition et au maintien du VWN. La conjonction de conditions climatiques (e.g., température et pluies élevées) favorables à la prolifération de moustiques, avec la présence de nombreux oiseaux migrateurs ou sédentaires susceptibles d'introduire et d'amplifier le VWN, pourrait ainsi entraîner l'apparition de nouvelles épidémies.

Cependant, les conditions d'occurrence d'épidémies causées par le VWN en Tunisie ne sont pas encore élucidées. Les informations disponibles ne permettent pas d'expliquer clairement l'épidémiologie de cette maladie, d'autant que les études de séroprévalence réalisées chez les équidés en 2005 [Bergaoui et al., 2007], 2007 et 2008 [El Ghoul, 2009] dans les zones touchées par les des deux épidémies de 1997 et 2003 n'ont pas permis de cerner l'étendue géographique de l'infection.

De nombreuses questions concernant les espèces d'oiseaux et les vecteurs impliqués dans la transmission d'une part, et les relations environnement et cycle de transmission d'autre part, doivent faire l'objet de travaux de recherches. L'objectif de notre travail de thèse est ainsi de mieux connaître l'épidémiologie de la FWN en Tunisie, d'en tirer des propositions pour améliorer la surveillance de la FWN, et de discuter leur intérêt pour la surveillance de la FWN chez l'Homme. Pour atteindre ces objectifs, nous avons tenté de répondre aux questions de recherche suivantes:

- Quels sont les principaux écosystèmes et périodes de l'année les plus favorables à la transmission du VWN?
- Comment le VWN se maintient-il en Tunisie?
- Quelles sont les espèces d'oiseaux susceptibles d'intervenir dans l'introduction et l'amplification du VWN?
- La surveillance des méningo-encéphalites équine permet-elle de mettre en évidence l'activité du VWN en Tunisie?

Chapitre1 : état des connaissances sur la fièvre West Nile

1 Le virus West Nile

1.1 Taxonomie et structure

Le virus West Nile (VWN) appartient à la famille des Flaviviridae, genre *Flavivirus* qui regroupe de nombreux virus classés en 8 complexes taxonomiques. Le VWN appartient au séro groupe du virus de l'encéphalite japonaise (EJ) [Calisher et al., 1989, Heinz, 2000]. Récemment, des virus proches ont été identifiés en Europe : le virus Usutu (USUV), rencontré jusque là en Afrique, a été isolé en Autriche, en Hongrie, en Allemagne, en Suisse, en Italie et en Espagne [Savini et al., 2011, Becker et al., 2012]. Un virus émergent, le virus Bagaza (BAGV), a été identifié en Espagne en 2010 [Agüero et al., 2011]. Les *Flavivirus* ont des propriétés antigéniques proches, en particulier ceux du complexe de l'EJ, ce qui cause des réactions sérologiques croisées fréquentes [Calisher et al., 1989] entraînant des difficultés de diagnostic.

Le VWN est un virus à ARN positif, simple brin et enveloppé de 45 à 50 nm de diamètre (Figure 1). Le génome de VWN est petit (11 000 à 12 000 nucléotides) et comporte deux régions non codantes aux extrémités 3' et 5'. Il code pour 10 protéines dont 3 sont structurales (protéines C, M et E) et 7 sont non structurales « NS » [Brinton, 2002, Petersen et Roehrig, 2001]. L'enveloppe virale dérive de la membrane cellulaire de l'hôte et contient 2 glycoprotéines. Les protéines E associées aux protéines M permettent l'adhésion aux cellules, le tropisme tissulaire, la stimulation des cellules immunitaires et la réplication [Kimura et Ohyama, 1988].

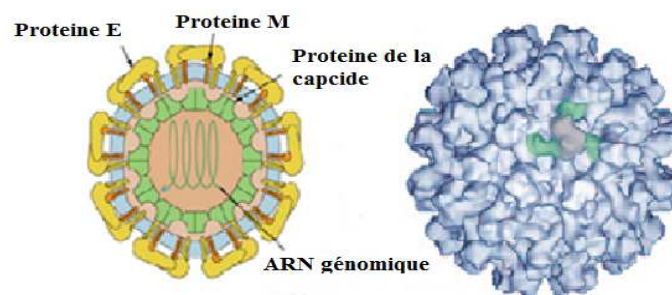


Figure 1. Structure du virus West Nile [Zhang et al., 2003]

La nucléocapside est formée d'un génome à ARN monocaténaire de polarité positive d'environ 11 Kb qui est constitué de deux extrémités non codantes entourant une longue phase de lecture ouverte codant pour les protéines structurales et non structurales du

virus [C. Chapel, 2004]. Les régions 5' et 3' non codantes sont constituées respectivement de 100 et 600 nucléotides. Elles sont riches en structures secondaires avec des successions de boucles et de séquences bi-caténares importantes dans la réplication et la transcription virales. L'extrémité 5' possède une coiffe méthylée [Campbell et al., 2002]. La région codante est formée par un seul cadre de lecture ouvert (ORF) codant pour une seule polyprotéine qui, grâce à des protéases cellulaires et une protéase virale, donne naissance à 3 protéines de structure (C, prM, E) localisées dans la partie N-terminale et 7 protéines non structurales (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B, NS5) dans la partie C-terminale [Zou et al., 2009] (Figure 2).

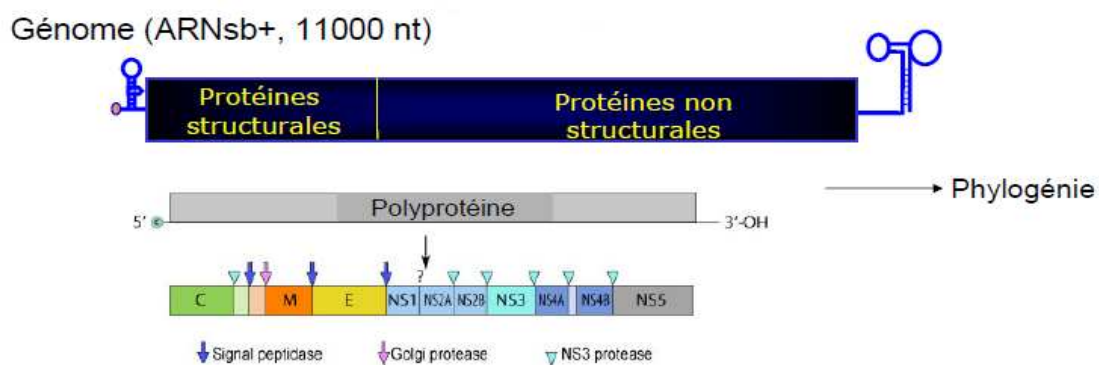


Figure 2. Organisation du génome viral du virus West Nile [Lecollinet, 2011].

Les protéines structurales comprennent une protéine de capsid (C) qui entoure l'ARN viral en le protégeant, une protéine pré-membranaire (prM) qui bloque la fusion virale prématurée, et une protéine d'enveloppe (E) qui sert d'intermédiaire à l'attachement viral, la fusion membranaire, et l'assemblage des virions [Samuel et Diamond, 2006].

La protéine C de la capsid est une protéine basique de 13 kda riche en résidus arginine et lysine [Murphy et al., 1995]. Elle joue un rôle important dans l'encapsulation de l'ARN viral et dans l'apoptose cellulaire [Yang et al., 2002]. Elle possède deux domaines hydrophobes assurant son ancrage aux membranes cellulaires, l'un au niveau de son extrémité C terminale et l'autre dans sa partie centrale [Berthet et al., 1997a].

La protéine Pr M est le précurseur de la protéine M ; elle existe sous forme glycosylée avec trois sites de N-glycosylation dans sa partie N-terminale [C. Chapel, 2004]. Elle est clivée au cours de la maturation, dans la vésicule de l'appareil de Golgi, donnant naissance à une protéine M non glycosylée de 8 kda possédant six ponts disulfure

[Murphy et al., 1995] Cette protéine est par la suite fixée à l'enveloppe virale par sa partie C-terminale hydrophobe.

La protéine d'enveloppe E est une protéine majeure de surface. Elle a une taille de 50 kda et elle existe toujours sous forme glycosylée. C'est la principale protéine à la surface du virion. Elle est impliquée dans la reconnaissance du récepteur et la fusion à la membrane plasmique et l'assemblage viral [Diamond, 2009]. C'est une protéine hautement glycosylée et sa glycosylation est un facteur déterminant dans la neuroinvasion du VWN [Beasley, 2005].

Les protéines non structurales assurent des fonctions enzymatiques indispensables à la réplication virale. La protéine NS1 est une glycoprotéine de 50 kda trouvée à la surface des cellules infectées [Lindenbach et Rice, 2003]. Elle est synthétisée, au niveau de réticulum plasmique en même temps que la protéine E. La fonction de la forme extracellulaire de NS1 n'est pas connue. En revanche, elle est hautement immunogène [Dauphin et Zientara, 2007a]. Elle comporte des déterminants antigéniques entraînant la formation d'anticorps détectés par la réaction de fixation du complément [Murphy et al., 1995].

Les protéines NS2a et NS2b ont une taille d'environ 21 et 15 kda respectivement. La protéine NS2b joue un rôle important dans le clivage protéolytique [Murphy et al., 1995]. La protéine NS2a est impliquée dans l'assemblage des particules virales [Liu et al., 2003]. Elle est localisée dans les sites de réplication et interagit avec NS3 et NS5, ainsi qu'avec la région 3' non codante [Mackenzie et al., 1998].

La protéine NS3 est une protéine multifonctionnelle conservée de 70 kda connue sous le nom de protéase virale. Toutefois, cette région de NS3 ne serait une protéase active que sous la forme d'un complexe stable avec NS2b (cofacteur) ; elle possède trois activités enzymatiques : protéase, ARN hélicase et NTPase [Scaramozzino et Crance, 2002].

Les protéines NS4a et NS4b ont respectivement 15 et 29 kda et font partie intégrante de la membrane de réticulum endoplasmique [Murphy et al., 1995]. La protéine NS4A a été localisée au sein des complexes de réplication, ce qui suppose un rôle dans la réplication de l'ARN [Mackenzie et al., 1998].

La protéine NS5 est une protéine de 100 kda pourvue d'une activité ARN polymérase ARN dépendante. Elle s'associe à la protéine NS3 pour former le complexe de la réplicase

virale regroupant ainsi les activités enzymatiques de la NTPase, de l'hélicase et de la polymérase [Campbell et al., 2002]. Récemment, le rôle de la NS5 dans la suppression de la réponse innée de l'hôte a été démontré pour une souche hautement virulente du VWN, la souche NY99 [Laurent-Rolle et al., 2010].

1.2 Cycle de multiplication

Le cycle de multiplication du VWN est l'un des cycles viraux les plus courts. Il est entièrement cytoplasmique aboutissant à la formation de nouvelles particules virales libérées par bourgeonnement. Globalement, trois étapes constituent le cycle viral qui se déroule de la même manière chez les vecteurs et les hôtes vertébrés [Mukhopadhyay et al., 2003].

1.2.1 Adsorption, pénétration et décapsidation

Le cycle viral débute par l'attachement de la particule virale à son récepteur spécifique grâce à la protéine E. Après sa fixation à la membrane cytoplasmique, le virus pénètre dans la cellule par endocytose. A l'intérieur de la vacuole d'endocytose, une baisse de pH entraîne une organisation en trimères de protéines E. Ce changement de conformation entraîne la fusion de l'enveloppe virale et de la membrane de l'endosome libérant ainsi la nucléocapside dans le cytoplasme de la cellule hôte. Après dégradation de la capsid, le génome viral libéré est utilisé pour la réplication et la transcription.

1.2.2 Transcription et réplication du génome viral

L'ARN génomique, de polarité positive, joue le rôle de l'ARN messager. Il est directement traduit en une polyprotéine unique clivée par la suite pour donner les différentes protéines virales. Les protéines PrM, E, et NS1 sont synthétisées dans les vésicules du réticulum endoplasmique par clivage de la polyprotéine grâce au signal peptidase. Les protéines NS3 et NS5 sont produites dans le cytoplasme cellulaire. Enfin, le reste des protéines virales sont synthétisées au niveau transmembranaire.

Après transcription, le génome viral est utilisé pour la synthèse de brins complémentaires de polarité négative jouant le rôle de matrice pour la réplication virale. Les nouvelles molécules d'ARN synthétisées s'accumulent dans la cellule infectée. Elles vont soit s'associer à des polyribosomes, soit servir de matrice pour la synthèse de

nouvelles copies d'ARN négatif, elles même à l'origine de nouveaux complexes de réplication.

1.2.3 Morphogenèse et libération des virions

Cette étape débute dans les citernes de réticulum endoplasmique et se termine au niveau des vésicules de l'appareil de Golgi (Figure 3) où se fait l'accumulation des nouveaux virions formés. Dans un premier temps, on assiste à la synthèse et à la maturation des protéines PrM, E et NS1 ; ces protéines se retrouvent ancrées sur le côté interne de la membrane du réticulum par l'intermédiaire de leur extrémité C terminale. Ces protéines sont par la suite clivées par les protéases cellulaires ce qui leur permet d'acquérir leur conformation native avec formation de ponts disulfures et dimérisation de la protéine E. Les sous unités protéiques C, nouvellement synthétisées, se réunissent entre elles pour constituer des capsides vides qui seront pénétrées chacune par une copie du génome viral donnant naissance aux nucléocapsides.

Chaque nucléocapside interagit avec les protéines PrM et E, il en résulte par la suite une formation de particules virales immatures qui vont bourgeonner et s'accumuler dans la lumière du réticulum endoplasmique lui donnant un aspect gonflé. Ces particules immatures migrent par la suite dans les vésicules de l'appareil de Golgi où elles vont acquérir leur maturation par clivage de la protéine PrM. Les nouveaux virions ainsi formés sont par la suite libérés par exocytose dans le milieu extracellulaire [Mukhopadhyay et al., 2003].

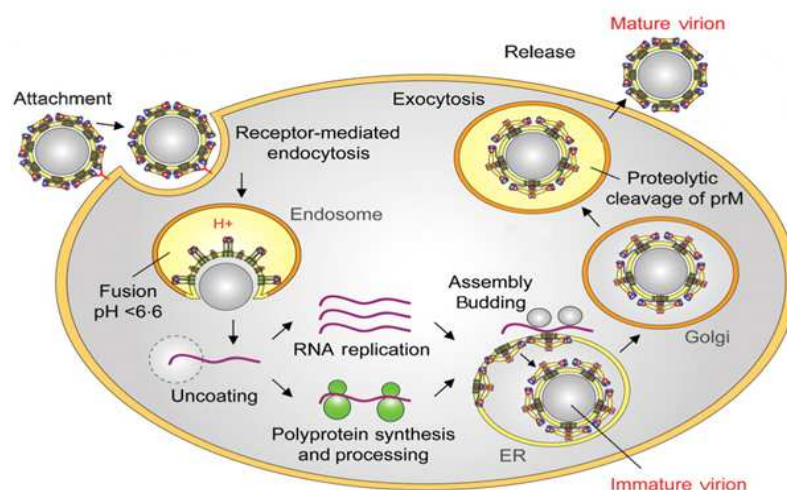


Figure 3. Cycle de multiplication du virus West Nile [Stadler et al., 1997]

1.3 Pouvoir pathogène

Les mammifères contractent principalement la FWN par l'intermédiaire des piqûres de moustiques. Les mammifères carnivores et les reptiles peuvent aussi être contaminés par la nourriture. La majorité des espèces non aviaires sont des hôtes finaux. Certaines espèces d'écureuils, de tamias, de lapins, de chats, d'alligators et de grenouilles peuvent développer des titres viraux plus élevés. Quelques-unes d'entre elles peuvent aussi évacuer le virus via leurs excréments, leurs sécrétions orales et leurs urines, et entraîner une propagation horizontale de la maladie. L'incidence épidémiologique des reptiles et des amphibiens sur la diffusion du VWN doit cependant encore être étudiée. La tique pourrait également jouer un rôle dans le maintien du cycle du virus [Hayes et al., 2005b].

En général, les souches virales appartenant au lignage 1 sont considérées comme plus virulentes que celles du lignage 2. Cependant, les expériences animales ont démontré que les phénotypes hautement ou faiblement neuro-invasifs existent dans les deux lignages [Beasley et al., 2004]. Pourtant considérés encore récemment comme peu pathogènes [Jupp, 2001, Zeller et Schuffenecker, 2004], ces virus de lignage 2 ont été associés à plusieurs dizaines de cas d'infections neuroinvasives chez le cheval ou l'Homme en Afrique du Sud en 2007-2008 [Venter et Swanepoel, 2010] et en Hongrie en 2008 [Kutasi et al., 2011].

Les mutations responsables de la virulence chez les virus de lignage 2 ont été déjà décrites chez les virus de lignage 1 tels que la substitution qui touche la protéine NS3 au niveau de l'acide aminé de la position 249 par la proline [Brault et al., 2007, Papa et al., 2010]. Aussi la glycosylation au niveau de la protéine E constitue un facteur important dans la détermination de pathogénicité [Beasley, 2005]. La majorité des souches VWN responsables d'épidémies graves sont glycosylées en position 154-156. Le tropisme du VWN est relativement diversifié ce qui lui permet de se répliquer dans plusieurs tissus humains et animale et de provoquer l'apparition de divers signes cliniques [Hayes et al., 2005b]. Chez les chevaux, et contrairement aux oiseaux, le VWN a un tropisme exclusif pour le système nerveux central (SNC) ; aucun antigène n'est détecté dans le système nerveux périphérique, ni dans autres tissus. Les antigènes viraux sont présents en faible quantité dans le tissu cérébral alors que les lésions inflammatoires sont importantes. Un faible nombre de virions peut être suffisant pour stimuler une réponse immune par un

mécanisme immunopathologique. Enfin, les mécanismes de pénétration du virus dans le SNC et la physiopathologie de l'encéphalite restent peu connus. Il est probable qu'une réplication virale se produise au niveau de la peau et des nœuds lymphatiques régionaux, suite à la piqure infectante. Durant la phase virémique, on suppose que le virus envahit le neuro-épithélium olfactif. Il infecte ensuite les neurones olfactifs par un transport axonal rétrograde. Une fois dans le SNC, il peut se disséminer rapidement dans tout le neuropile et se répliquer dans des zones particulières du SNC. Des analyses histopathologiques d'encéphales de chevaux malades ont montré une dégénérescence des cellules infectées du système nerveux central (SNC) et une nécrose avec une inflammation diffuse [Dauphin et Zientara, 2007b].

La plupart des infections au VWN sont non mortelles et sont éliminées par le système immunitaire de l'hôte. Cependant, le virus peut persister chez certains hôtes vertébrés [Ceccaldi et al., 2004, Kuno, 2001]. Cette propriété dépend de sa capacité à infecter les cellules cibles et à échapper à la reconnaissance du système immunitaire.

1.4 Pouvoir immunogène

L'immunité humorale est essentielle pour la protection contre le VWN. En effet, les immunoglobulines M (IgM) limitent la dissémination virale chez l'hôte vertébré. Elles sont détectées 2 à 8 jours après l'apparition des signes cliniques, soit environ 2 semaines après l'infection. Leur concentration sérique diminue au bout de quelques semaines à quelques mois. Elles sont généralement détectables même 2 à 4 mois après le début de l'infection mais peuvent persister plus longtemps [Bunning et al., 2002].

Les immunoglobulines G (IgG) apparaissent quelques jours après les IgM, généralement 12 à 14 jours après l'infection. Leur ascension est lente, atteignant un maximum au 21^{ème} jour et persistant durant toute la vie [Diamond, 2009, Gea-Banacloche et al., 2004]. Ces anticorps induisent une immunité protectrice à long terme (Figure 4). En cas d'atteinte neurologique, les IgM et IgG sont détectables précocement au niveau du liquide céphalo-rachidien dès les premiers jours des signes neurologiques ; leur présence est secondaire à une synthèse intrathécale d'immunoglobulines (l'intérieur des enveloppes constituant les méninges) ; elle est brève [Gea-Banacloche et al., 2004].

Une étude réalisée en 2006 précise les modalités de la réponse contre le WNV chez des chevaux infectés naturellement, en mesurant la réponse en anticorps durant une

infection naturelle et en précisant les épitopes contre lesquels est dirigée cette réponse [Sanchez et al., 2007]. Chez la souris un épitope majeur T332 localisé sur la surface latérale du domaine III de la protéine E du VWN qui joue un rôle majeur dans la réponse neutralisante [Beasley et Barrett, 2002, Oliphant et al., 2005]. Chez le cheval, cet épitope joue un rôle important dans la réponse immunitaire. Ainsi, la réponse en anticorps neutralisant chez le cheval apparaît comme variable et polyclonale, avec des épitopes présents aussi bien sur le domaine DIII de la protéine E que sur d'autres protéines.

En ce qui concerne la différence entre la réponse immunitaire à médiation humorale suite à l'infection par un virus à lignage 1 ou à lignage 2, il a été démontré, par des inoculations expérimentales, qu'il n'y a pas de différence entre une infection par un virus de lignage 1 ou de lignage 2, puisque les sérums d'animaux infectés présentent une activité neutralisante comparable lors d'infection par l'un ou l'autre lignage [Castillo-Olivares et al., 2011].

Des réactions croisées entre les anticorps dirigés contre le VWN et d'autres *Flavivirus* tels que le virus Usutu, le virus de l'encéphalite de St Louis ou le virus de l'encéphalite japonaise sont fréquents, et peuvent être responsables de réactions sérologiques faussement positives attribuées au VWN [Dauphin et Zientara, 2007b]. L'interprétation des résultats sérologiques peut être délicate lors de l'utilisation d'un ELISA. Des tests de confirmation avec les méthodes de références telque la séroneutralisation des plages de lyse sont nécessaires, particulièrement en zone de circulation de plusieurs *Flavivirus*.

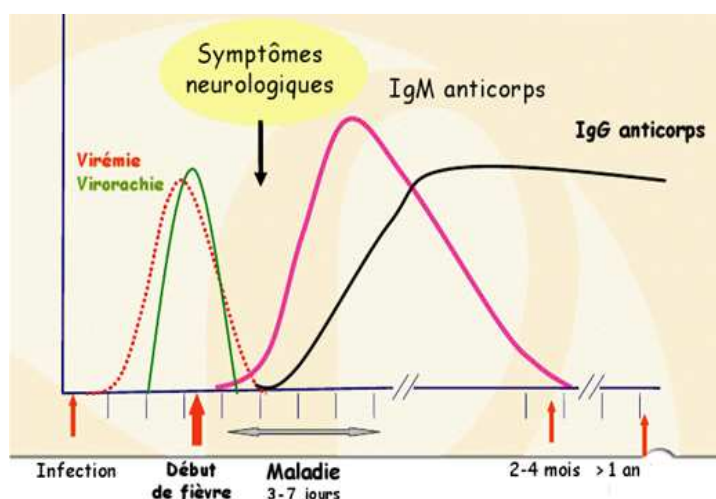


Figure 4. Cinétique d'apparition des anticorps après infection par le virus West Nile [Lecollinet, 2011]

1.5 Répartition géographique

Des cas sporadiques et des épidémies de FWN chez l'homme et les équidés ont été rapportés après la découverte du VWN en 1937 en Ouganda. Dans les années 1990, une augmentation de l'activité du VWN a été observée, avec d'importantes épidémies en Europe : Roumanie (1996), Russie (1999) et bassin méditerranéen (1994, 1997, 1998-2000), avec des centaines de cas humains [Murgue et al., 2001a]. Le virus a également été introduit aux Etats-Unis en 1999 où il a causé une importante épidémie et épizootie, et s'est étendu progressivement vers le Canada, l'Argentine et le Brésil [Randolph et Rogers, 2010]. A partir des années 2000, une circulation de plus en plus forte du VWN a été observée en Europe centrale et dans le bassin méditerranéen, avec des épidémies importante en Albanie, en Hongrie, en Israël, en Italie, en Macédoine, dans le territoire palestinien, en Roumanie, en Fédération de Russie, en Serbie, en Espagne, en Ukraine, en Tunisie, en Turquie, et en Grèce (2010-2012) [Calistri et al., 2010, Sirbu et al., 2011].

2 Lignages et souches : phylogéographie

L'identification et la classification de différentes souches de VWN ont été réalisées en utilisant les tests de séroneutralisation et d'immunofluorescence indirecte, mais l'analyse de la séquence nucléotidique du génome viral à partir des gènes codant pour les protéines E ou NS 5, ou bien le séquençage du génome viral complet, ont permis d'identifier plus clairement les relations et les distances entre les souches virales et de définir la notion de lignage de virus [Castillo-Olivares et al., 2011].

Les analyses phylogénétiques s'appuyant sur le séquençage des ARN viraux et la comparaison des séquences obtenues, montrent que les souches du VWN sont génétiquement très variables et peuvent être classées en au moins 5 lignages dont les séquences nucléotidiques peuvent diverger jusqu'à 30% [Bondre et al., 2007] (Figure 5).

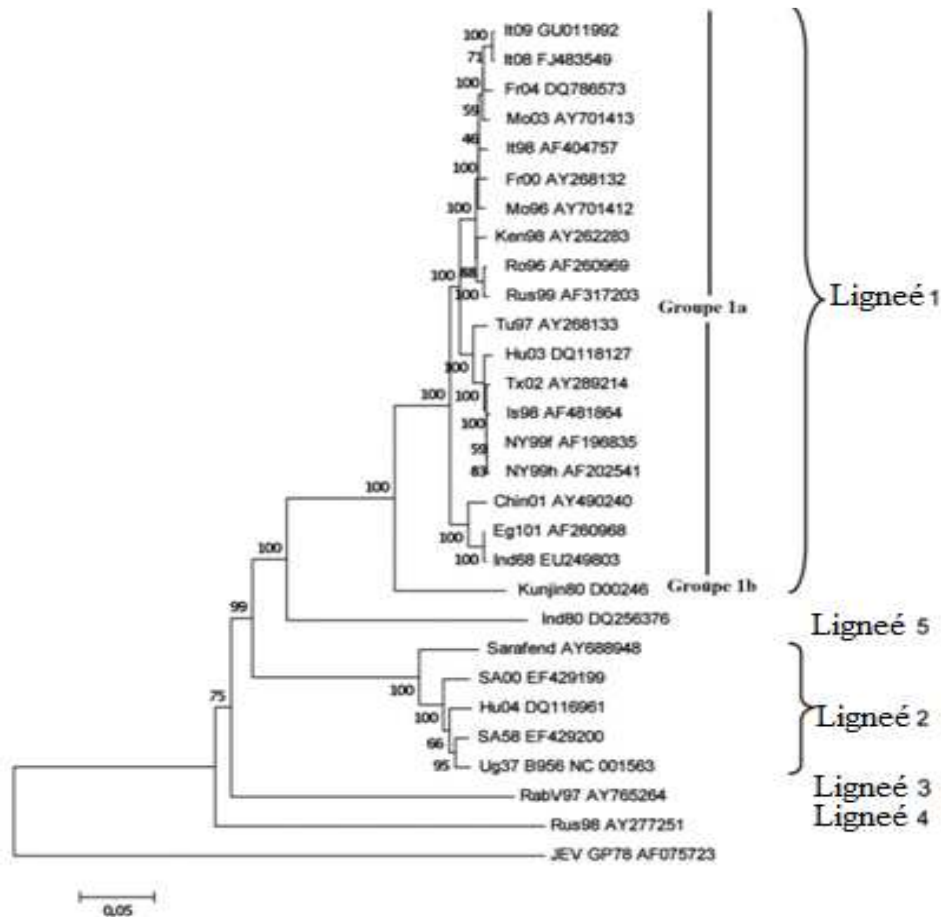


Figure 5. Arbre phylogénétique du virus West Nile, établi à partir du séquençage du génome complet des souches virales.

Code des souches : It Italie, Fr France, Mo Maroc, Ken Kenya, Ro Roumanie, Rus Russie, Tu Tunisie, Hu Hongrie, Tx Texas, Is Israël, NY New York, Chin Chine, Eg Egypte, Ind Inde, SA Afrique du Sud, Ug Ouganda, Gr Grèce, Kunjin virus présent en Australie, Sarafend prototype des souches de lignée 2, RabV virus Rabensburg, République Tchèque. Les deux chiffres suivant indiquent l'année d'isolement (04 pour 2004, 96 pour 1996) et la fin du code est le numéro d'enregistrement dans Genbank [Kutasi et al., 2011].

Les VWN appartenant au lignage 1 présentent la distribution géographique la plus large et ont été décrits en Afrique de l'Ouest, au Moyen Orient, en Europe du Sud, en Europe centrale, en Amérique et en Australie. Ils ont été à l'origine de la majorité des épidémies jusqu'en 2008 [Calistri et al., 2010]. Le lignage 1 peut être divisé en 3 clusters : le premier regroupe les isolats de l'Inde, le second correspond au virus Kunjin isolé en Australie, et le troisième représente les virus isolés en Europe, Afrique et au Moyen-Orient [Lanciotti et al., 2002, Lanciotti et al., 1999]; Burt et al, 2002; [Beasley et al.,

2004]. Les VWN de lignage 2, initialement isolés en Afrique (Sénégal, Ouganda, République centrafricaine, Kenya et Madagascar), ont probablement été introduits en Europe centrale par les oiseaux migrateurs venant d'Afrique en 2004 [Bakonyi et al., 2006]. Un nouveau lignage (3) du VWN (virus Rabensburg 97-103 : RabV 97-103) a été isolé en République tchèque en 1997 à partir de moustiques *Culex pipiens*, après des inondations survenues dans le sud de la Moravie [Bakonyi et al., 2006]. Les VWN du lignage 4 circulent en Russie depuis au moins 1988. Ce lignage comprend un virus isolé à partir d'une tique dans le sud-ouest de la région du Caucase de la Russie [Lvov et al., 2004] et d'autres virus isolés de moustiques et de grenouilles à Volgograd entre 2002 et 2006. En 2007, une étude sur les isolats indiens a suggéré l'existence d'un lignage supplémentaire (5) [Bondre et al., 2007]. Une reclassification en tant que lignage 6 a été proposée pour le virus de Sarawak Kunjin. Un septième lignage a été suggéré pour le virus africain Koutango, qui est proche du WNV [Mackenzie et Williams, 2009] ainsi qu'un huitième lignage pour des séquences virales détectées chez des moustiques *Cx pipiens*, capturés dans le Sud de l'Espagne pendant l'été 2006 [Vazquez et al., 2010].

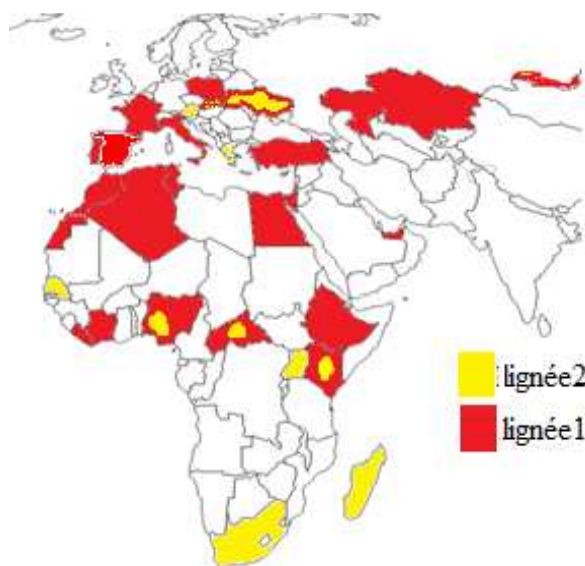


Figure 6. Répartition géographique des virus West Nile de lignages 1 et 2.

Le VWN, en tant que virus à génome à ARN, a la capacité d'évoluer rapidement pour s'adapter à son écosystème [Zientara et Lecollinet, 2010]. Des souches de lignage 1 et 2 circulent en Afrique (Figure 6) et ont des distributions qui se recouvrent dans certaines régions. Les observations épidémiologiques du lignage 2 du VWN en Europe au cours des années 2004 à 2010, ont montré qu'il y avait une parenté génétique entre les VWN

qui ont circulé en Hongrie et en Autriche et ceux isolés sur des moustiques *Cx. pipiens* pendant l'épidémie de 2010 en Grèce. Très probablement, les descendants de la souche circulant en Hongrie 2004 se sont propagées vers le sud de la péninsule des Balkans et ont atteint le nord de la Grèce [Papa et al., 2010].

Le lignage 1 comprend de souches isolées en Afrique, Europe, Asie et Amérique (Figure 7). Parmi celles-ci, on peut distinguer plusieurs clusters [Schuffenecker et al., 2005]. Un cluster comprend les souches américaines et israéliennes de 1998 et 2000, plus une souche qui a provoqué la mort d'oies en Hongrie en 2003 [Bakonyi et al., 2006]. Un autre cluster regroupe des souches européennes, méditerranéennes et africaines [Zeller et Schuffenecker, 2004, Jourdain et al., 2007a].

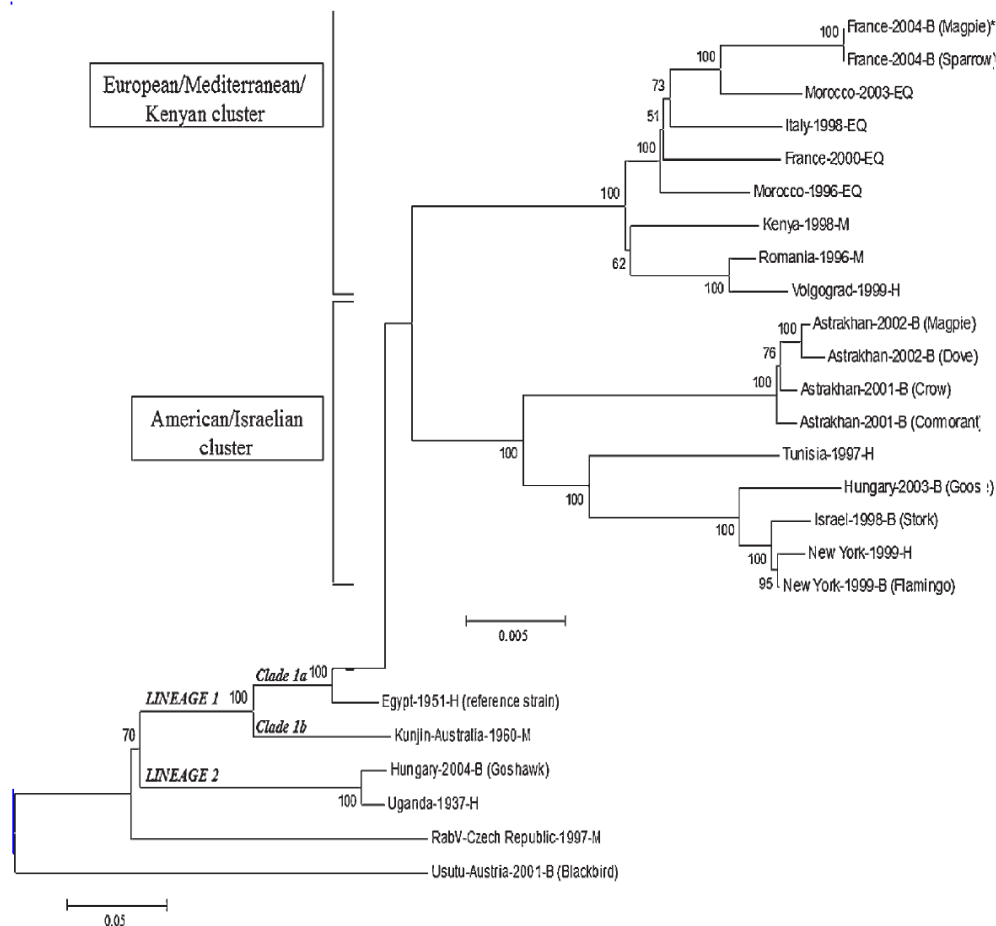


Figure 7. Arbre phylogénétique des virus West Nile basé sur le séquençage complet du génome viral et montrant les groupes 1a et 1b (lignage 1) et le lignage 2 [Jourdain et al., 2007b]

Entre août et septembre 1994, une épidémie de VWN a eu lieu en Algérie. Environ 50 cas ont été suspectés dans un village de l'oasis de Timimoune. L'infection a causé la mort de 8 patients [Murgue et al., 2001a]. Deux ans plus tard, en 1996, une épidémie de VWN a été décrite chez les chevaux des provinces de Kénitra et Larache au Maroc avec 42 morts chez les équidés [Tber, 1996]. En 1997, 173 patients ont été hospitalisés en Tunisie avec des symptômes de méningite et de méningo-encéphalite [Murgue et al., 2001a, Triki et al., 2001]. Huit décès ont été signalés. En 2003, au Maroc, dans la même zone que l'épidémie de 1996, 9 cas d'encéphalites, dont 5 décès, ont été signalés chez des chevaux [Schuffenecker et al., 2005].

En 1996, 393 patients ont été atteints de FWN à Bucarest. Parmi eux, 352 présentaient des symptômes nerveux et 17 patients sont décédés [Tsai et al., 1998]. Après la première épidémie, d'autres investigations dans les années suivantes ont confirmé la circulation du virus chez l'homme [Cernescu et al., 2000a], les oiseaux et les chevaux [Ionescu et al., 2006]. En 1997, un an après le l'épidémie roumaine, cinq cas humains ont été confirmés à Břeclav en République tchèque [Hubálek et Halouzka, 1999]. En 1999, une épidémie de grande ampleur est survenue dans la ville de Volgograd (Russie), où 826 patients ont présenté des signes de méningo-encéphalite infectieuse aiguë. Le VWN a été confirmé dans 183 cas, dont 40 ont trouvé la mort [Platonov et al., 2001].

Entre 1962 et 1965, des cas humains et équins ont été détectés en Camargue (France), et le virus a été isolé à partir de moustiques *Culex modestus* [Hannoun et al., 1964]. Avant 1970, une épizootie d'encéphalomyélite équine a été enregistrée dans le sud du Portugal [Filipe et de Andrade, 1990]. En 1971, dans le même pays, le VWN a été isolé à partir d'*Anopheles maculipennis* [Filipe, 1972]. En 1979, l'infection par le VWN a été suspectée dans le delta de l'Ebre (Espagne) [Filipe et de Andrade, 1990]. En 1998, le VWN a été mis en évidence chez 14 chevaux de la Vallée de Val di Nievole en Italie [Cantile et al., 2000] dont 6 ont succombé.

En Camargue (France), de septembre à novembre 2000, l'infection par le VWN a été confirmée chez 76 chevaux dont 21 ont trouvé la mort [Murgue et al., 2001a]. En 2003, de nouveaux cas ont été décrits chez l'homme et les chevaux. En 2004, la maladie a été signalée chez les chevaux [Leblond et al., 2007]. Dans la même année, un cas de méningite infectieuse due au VWN a été diagnostiqué en Espagne [Kaptoul et al., 2007].

En 2004, le VWN a été détecté aussi chez des moustiques (*Culex pipiens* et *Cx univittatus*) dans 6 des 57 groupes de moustiques prélevés dans le sud du Portugal. L'analyse phylogénétique a démontré une relation étroite des souches du VWN circulant dans le bassin méditerranéen (Italie, 1998 ; France, 2000, le Maroc, 2003) [Esteves et al., 2005].

En 2008, une flambée épizootique a concerné huit provinces italiennes dans trois régions du Nord (Émilie-Romagne, Vénétie, Lombardie) [Filipponi G et G, 2005], avec un total de 794 cas équins dont seuls 5 sont morts [Calistri et al., 2009a]. Dans la même région et au cours de l'année 2008, 9 cas humains, dont 4 avaient des symptômes neuro-invasifs, ont été détectés [Gobbi et al., 2009, Rossini et al., 2008].

L'analyse phylogénétique des isolats a indiqué une similarité de 98,8% en nucléotides avec la souche isolée en Toscane au cours de 1998 [Savini et al., 2008]. En 2009, une nouvelle épidémie est réapparue dans la même zone.

Plusieurs cas humains ont été déclarés en Israël dans les années 1950 [Murgue et al., 2001a] mais aucune déclaration n'a été faite de 1957 jusqu'à la fin des années 1990. En 1998, un groupe d'un millier de cigognes blanches (*Ciconia ciconia*) a effectué une migration d'automne de l'Europe du Nord vers l'Afrique. Des vents violents les ont forcées à interrompre sa route et à atterrir dans le sud d'Israël. Le VWN a été isolé à partir de certaines cigognes retrouvées mortes [Malkinson et al., 2002]. Les mois suivants, des élevages d'oies en Israël ont connu de la mortalité (jusqu'à 40 %) associée au VWN [Malkinson et al., 2002]. Cet épisode a montré le rôle des oiseaux migrateurs dans l'introduction du VWN. Il s'agissait, de plus, de la première description de mortalité aviaire importante associée au VWN en conditions naturelles. En 1999, des milliers d'oies ont été détruites lorsque le VWN a infecté un troupeau commercial. La plus grande épidémie a été signalée d'août à octobre 2000, dont 417 cas confirmés au laboratoire [Chowers et al., 2001, Weinberger et al., 2001].

Entre 2003 et 2007, une moyenne annuelle de 6 cas humains d'encéphalite ont été diagnostiqués en Hongrie. En 2008, dans le même pays, 14 cas humains ont été signalés pendant les mois d'août et septembre [Krisztalovics et al., 2008].

Le lignage 2 du VWN (Figure 8) contient des souches isolées en Afrique subsaharienne et à Madagascar. Néanmoins, une souche de lignage 2 a été isolée en 2004 en Hongrie [Bakonyi et al., 2006] ou elles ont été responsables en Hongrie depuis 2008 de plus de

18 cas de méningo-encéphalite chez le cheval et 14 cas chez l'Homme. Depuis 2010, ils se sont installés en Grèce.

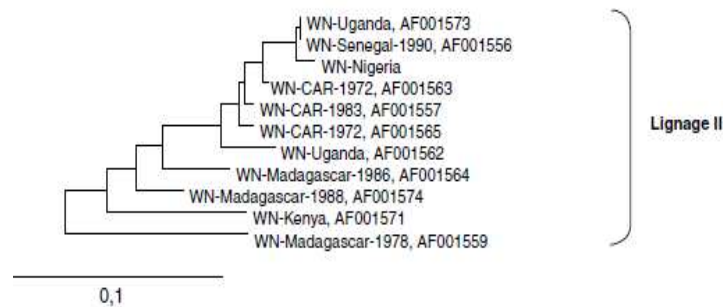


Figure 8. Arbre phylogénétique des virus West Nile basé sur une région de 254 paires de bases du gène de la glycoprotéine d'enveloppe E et montrant les virus de lignage 2 [Murgue et al., 2001a].

Divers auteurs ont étudié l'épidémiologie moléculaire des souches du VWN en utilisant des approches phylogénétiques classiques [Berthet et al., 1997a, Charrel et al., 2003, Lanciotti et al., 2002], mais des études phylogéographiques supplémentaires sont nécessaires pour améliorer les modèles de circulation, d'origine et de migration des génotypes du VWN. Ces études pourraient aider à élucider l'histoire épidémiologique et les itinéraires de diffusion de l'épidémie, et pourraient contribuer à la planification des stratégies de prévention [Pybus et Rambaut, 2009].

Le VWN est un virus diversifiée sur le plan génétique et sur le plan de répartition géographique. Au cours des dernières années, les méthodes d'analyse phylogéographique ont beaucoup évolué. Une image plus claire de la phylogéographie du VWN est apparue suite aux travaux de May et de Zehender en 2011. Ces auteurs ont analysé des séquences complètes de virus de lignage 1. A l'aide d'un modèle d'horloge moléculaire, ils ont estimé un taux moyen de substitution des acides aminés de $0,86 \times 10^{-3}$ substitutions par site et par an pour l'ensemble du génome du VWN. Ce taux est comparable à celui estimé dans d'autres études du VWN, et avec d'autres *Flavivirus* [Zehender et al., 2011]

Sur la base de ces résultats, une reconstruction spatiale et temporelle de l'épidémiologie du VWN-1a en Europe et plus spécifiquement dans le bassin méditerranéen a été réalisée. Ce génotype a vraisemblablement une origine en Afrique subsaharienne au début du XXe siècle. Il a été exporté vers le nord à plusieurs reprises dans les années

1970 et 1980, en suivant le trajet de l'Est qui relie Israël avec la Russie et l'Europe centrale (Figure 9). Dans les années 1990, une souche sub-saharienne appartenant à la lignée VWN-1a s'est propagée au Maroc puis en Europe occidentale, où elle est toujours présente. La question est de savoir si la persistance de cette souche en Europe occidentale est due à sa réintroduction récente depuis l'Afrique occidentale ou au fait que l'infection est devenue endémique dans le bassin méditerranéen. La souche en cause dans les foyers italiens (équins / humains) de 2008 et 2009 est génétiquement proche des isolats obtenus à partir de foyers en France (2004) [Jourdain et al., 2007a], au Portugal en 2004 [Parreira et al., 2007] et au Maroc (2003) [Schuffenecker et al., 2005].

Il semble que les VWN ont réussi à se maintenir dans une zone donnée plusieurs années successives et en particulier passer l'hiver des pays tempérés comme en Italie en 2008-2009 [Monaco et al., 2010] et en Espagne (2007-2008). Les souches isolées dans le même foyer avec quelques années d'écart été souvent très proches comme en Israël en 1998 et 2000, à Volgograd en 1999 et 2000 ou en France en 2000 et 2004 [Jourdain et al., 2007a, Schuffenecker et al., 2005], ce qui suggère la persistance locale de la souche. Cela signifie que les VWN peuvent établir des cycles endémiques dans des régions si certaines conditions sont remplies. Il existe différentes hypothèses non exclusives pour expliquer ce phénomène :

- le maintien d'une transmission virale à bas bruit pendant l'hiver,
- une infection virale chronique chez les oiseaux,
- une persistance virale chez le vecteur.

En Californie la persistance d'une transmission à bas bruit n'a pas été mise en évidence pendant l'hiver, moins rude que dans le Sud européen : aucune séroconversion de sentinelles (190 poulets) [Reisen et al., 2006a].

En revanche, le virus peut se maintenir chroniquement dans les organes des oiseaux pendant au moins 6 semaines après infection expérimentale [Reisen et al., 2006b], mais les conditions d'initialisation d'un nouveau cycle restent à élucider (relargage du virus dans le sang, contamination par voie orale).

La possible persistance du virus chez le vecteur a été mise en évidence en conditions naturelles, par la présence du virus West Nile (isolement ou RT-PCR) chez des femelles *Cx. pipiens* en diapause hivernale dans le nord-est des États-Unis [Farajollahi et al., 2005,

Nasci et al., 2000]. En effet, ce sont les femelles qui passent l'hiver chez les *Culex* et les *Anopheles*, alors que, chez les *Aedes*, le stade quiescent est l'œuf [Mitchell, 1988]. Ainsi, des femelles *Culex* infectées à la fin de la saison pourraient maintenir le virus jusqu'au printemps suivant. La persistance du virus chez les *Culex* passe nécessairement par une transmission verticale, c'est-à-dire une transmission de la femelle infectée à sa descendance qui entrera en diapause [Reisen et Milby, 1987]. Dans ce cas, les *Aedes* peuvent aussi permettre la persistance du virus pendant l'hiver. L'existence d'un tel phénomène en conditions naturelles est suggérée par l'isolement du VWN chez un mâle *Cx. univittatus* au Kenya (possible transmission sexuelle) [Miller et al., 2000] et démontrée par l'isolement du virus chez des adultes *Cx. quinquefasciatus* issus de larves collectées en Californie [Reisen et al., 2006b]. Enfin, la transmission verticale du VWN a été reproduite au laboratoire en 1990 pour *Ae. albopictus*, *Ae. aegypti* et *Cx. tritaeniorhynchus* [Baqar et al., 1993].

L'importance des oiseaux migrateurs dans la dissémination du VWN à partir de leurs sites d'hivernage en Afrique sub-saharienne vers les zones de reproduction en Afrique du Nord et en Europe (et réciproquement), et la circulation du virus par le biais des oiseaux résidents sont maintenant bien établis. Les introductions possibles en Afrique du Nord et au Moyen Orient depuis l'Europe ont été montrées suite à des études sur un groupe de cigognes blanches (*Ciconia ciconia*) qui a atterri en Israël pendant sa migration d'automne du Nord vers le Sud, en provenance de leur site de reproduction en Europe de l'Est [Malkinson et al., 2002].

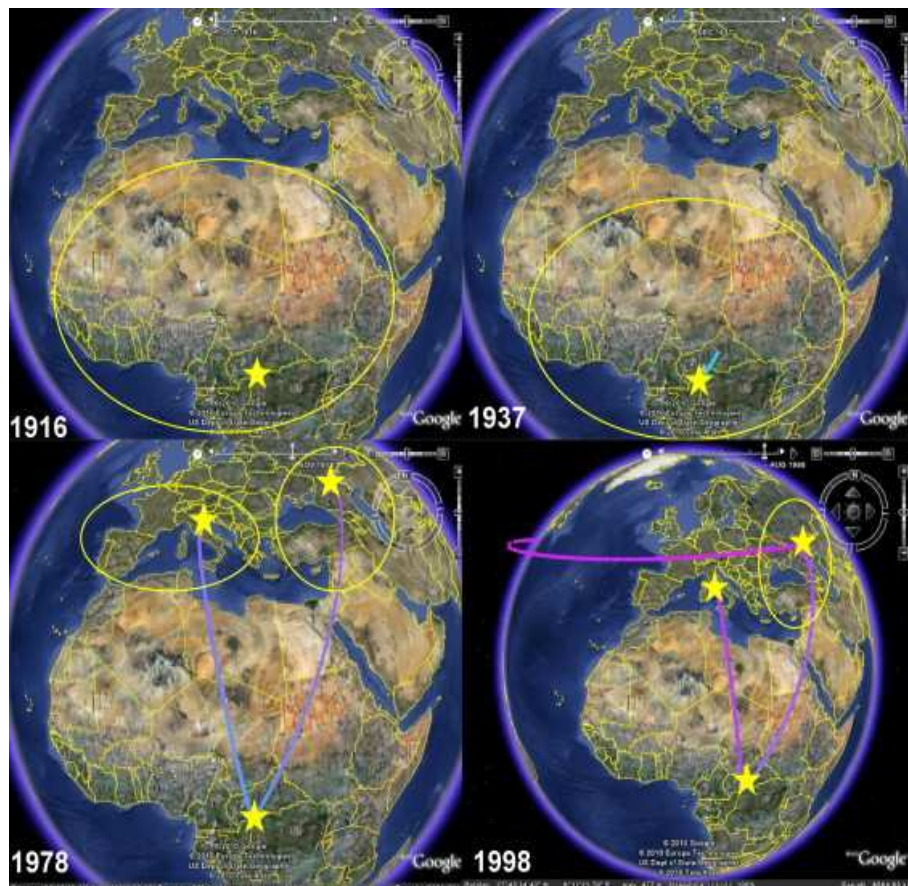


Figure 9. Dynamique hypothétique de diffusion temporelle et spatiale du virus West Nile du clade 1a d'après les données phylogéographiques [Zehender et al., 2011]

3 Le cycle de transmission du virus West Nile

Le cycle de transmission du VWN est complexe car il fait intervenir de nombreux acteurs. L'amplification du virus (cycle enzootique) s'effectue entre oiseaux et moustiques ornithophiles, principalement du genre *Culex*. Un passage accidentel (épizootique) peut se produire entre des « moustiques passerelles » (en anglais : *bridge species*), aux préférences trophiques opportunistes (à la fois ornithophiles et mammophiles) et des mammifères (homme et équidés) qui sont considérés comme des culs de sacs épidémiologiques car leur virémie est courte et de faible amplitude et elle ne permet pas d'infecter les moustiques vecteurs potentiels.

L'homme et les équidés sont sensibles à l'infection avec une majorité de cas non symptomatiques. La présence d'anticorps spécifiques chez des vertébrés très variés, incluant des mammifères, des amphibiens et des reptiles, indique que ce virus a la faculté d'infecter de très nombreuses espèces [Taylor et al., 1956]. En effet des infections

expérimentales ont été menées chez différentes espèces de mammifères [Van der Meulen et al., 2005] La plupart développent des virémies de courte durée et de faible intensité : le macaque rhésus, le mouton [Taylor et al., 1956], le chien [Komar, 2000] et le porc adulte [Teehee et al., 2005]. Néanmoins, pour certains, la virémie semble suffisante pour l'infection de moustiques, comme le chat, chez qui la virémie dure 3 à 5 jours. Les lémuriens (*Lemur fulvus*) présentent quant à eux des virémies pendant 5 à 6 jours qui permettent d'infecter à maintes reprises des femelles d'*Ae. aegypti* [Rodhain F., 1985].

Pour les petits mammifères, la situation semble différente, puisque des cycles de transmission entre moustiques et souris ou hamsters sont possibles en conditions de laboratoire [Xiao et al., 2001] et que le lapin à queue blanche (*Sylvilagus floridanus*) présente une virémie suffisante pour infecter *Cx. pipiens*, *Cx. salinarius*, *Ae. albopictus* et *Ae. aegypti* [Tiawsirisup et al., 2005]. Ainsi, le rôle de la plupart des mammifères en tant que source du virus West Nile pour les vecteurs est sans doute anecdotique. Mais cette règle admet des exceptions ; c'est pourquoi les mammifères ne devraient pas être exclus a priori de l'étude des cycles de transmission.

L'hypothèse que des amphibiens et des reptiles pourraient jouer le rôle de réservoirs du VWN a été émise aussi [Hubálek et Halouzka, 1999, Rodhain F., 1985]. En effet, au Tadjikistan, des cycles de transmission du VWN existeraient entre des grenouilles (grenouille rieuse, *Rana ridibunda*) et les moustiques [Kostyukov et al., 1986]. Ainsi, la question du rôle des amphibiens ou des reptiles comme hôtes amplificateurs peut se poser, d'autant que la proportion de repas des *Culex*, en particulier *Cx. pipiens*, sur amphibien ou reptile peut être importante [Kostyukov et al., 1986].

Chez quasiment tous les amphibiens ou reptiles inoculés avec le VWN aux États-Unis, la virémie est faible ou indétectable [Klenk et Komar, 2003]. Par contre les alligators juvéniles (*Alligator mississippiensis*) développent des virémies élevées (105,8 PFU/ml) et de longue durée (10 à 14 jours) [Klenk et Komar, 2003]. Ils peuvent être considérés comme des hôtes amplificateurs, par exemple dans les fermes d'alligators (Floride).

L'épidémiologie du VWN (Figure 10) peut donc se diviser en deux phases :

- Un cycle moustiques – oiseaux assurant la persistance virale dans l'environnement, les oiseaux permettant l'amplification de la circulation virale,

- Une seconde phase révélatrice de cette amplification, se produisant surtout lors d'événements environnementaux permettant la synchronisation des dynamiques des populations d'oiseaux et de moustique, par exemple de fortes pluies aboutissant à des proliférations de moustiques au moment du séjour de populations importantes d'oiseaux migrateurs et/ou sédentaires. La forte amplification virale en résultant peut alors aboutir à la transmission du VWN à des hôtes (hommes, équidés) habituellement peu exposés aux piqûres de moustiques.

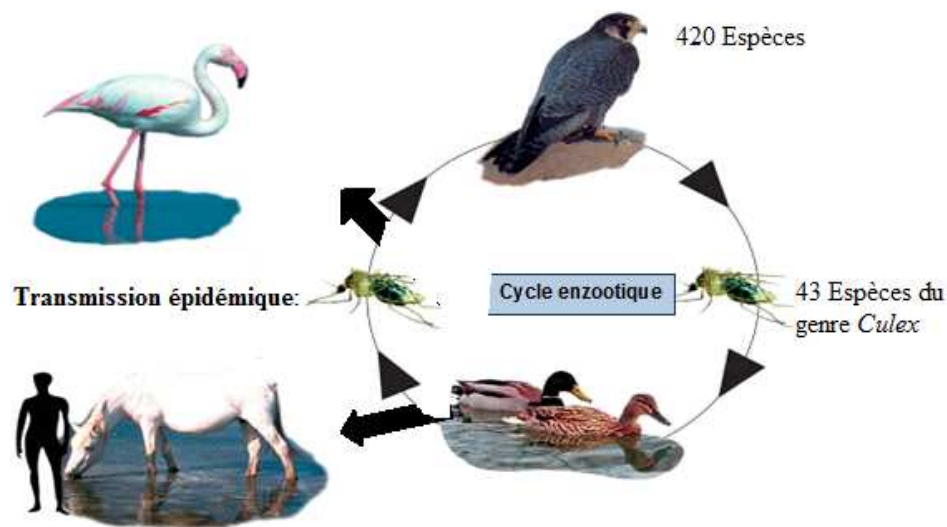


Figure 10 : Représentation schématique de l'épidémiologie du virus West Nile

3.1 Le cycle enzootique

3.1.1 Les vecteurs

Les moustiques sont les principaux vecteurs biologiques du VWN. La transmission expérimentale du VWN par les moustiques a été réalisée dès 1943 [Philip et Smadel, 1943] et le rôle des moustiques comme principaux vecteurs de ce virus est accepté depuis les années 1950 [Taylor et al., 1956]. Le VWN a été isolé chez plus de 50 espèces de moustiques, en particulier chez celles du genre *Culex* [Hubálek et Halouzka, 1999, Zeller et Murgue, 2001].

Les principales espèces impliquées dans la transmission du VWN appartiennent au genre *Culex*. Il s'agit de *Cx univittatus*, *Cx antennatus* et *Cx pipiens* en Égypte [Taylor et al., 1956], de *Cx pipiens* et *Cx univittatus* en Israël [Nir et al., 1972], de *Cx univittatus* et *Cx*

theileri Theobald en Afrique du Sud [McIntosh et al., 1967], de *Cx modestus* et *Cx pipiens* en Europe et Russie [Savage et al., 1999] et de *Cx tritaeniorhynchus* et *Cx quinquefasciatus* en Inde et au Pakistan [Akhter et al., 1982]. Aux États-Unis, on soupçonne dans le nord-est *Cx pipiens*, *Cx restuans* et *Cx salinarius* [Lukacik et al., 2006], et au sud *Cx restuans* Theobald, *Cx quinquefasciatus* associé à *Cx nigripalpus* à l'est et *Cx restuans* à l'ouest [Hayes et al., 2005a].

L'existence de vecteurs passerelles est suspectée à cause de l'isolement répété du VWN chez des espèces mammophiles, comme *Ae. vexans* aux États-Unis [Andreadis et al., 2004] et en Russie, ou comme *Coquillettidia richiardii* (Ficalbi) en Russie [Berezin, 1971]. De même, *Aedes albopictus* (Skuse) est souvent suspecté de jouer ce rôle, car il est compétent pour le VWN et présente des préférences trophiques opportunistes [Turell et al., 2005]

Le virus a été isolé à partir d'autres arthropodes hématophages comme les tiques qui pourraient avoir un rôle important notamment dans les mécanismes de persistance [Schmidt et Said, 1964]. Dans certaines zones chaudes et sèches [Hubálek et Halouzka, 1999], le VWN a été isolé de différentes espèces d'Argasidae (tiques molles) et d'Ixodidae (tiques dures) et autres acariens nidicoles [Mumcuoglu et al., 2005] à travers l'Afrique et l'Eurasie.

Au cours de différentes expériences, les Ixodidae (tiques dures) ne se sont pas révélées capables de transmettre le VWN. Après inoculation, les tiques dures sont moins aptes que les moustiques à amplifier le VWN [Hurlbut, 1956]. Le taux d'infection des larves, nymphes ou adultes, fixés sur des animaux virémiques, est faible (10 à 40 %). Pour les individus infectés, le virus peut être maintenu par transmission trans-stadiale jusqu'à l'adulte, mais n'est pas transmis à la descendance [Anderson et al., 2003]. Aussi, les tiques dures ne semblent-elles jouer aucun rôle dans la transmission. La situation est différente pour les Argasidae dont certaines espèces sont réfractaires à l'infection et se montrent incapable de transmettre le VWN : *Ornithodoros savignyi* (Audouin), *Argas persicus* (Oken) et *A. hermanni* [Abbassy et al., 1993]. Au contraire, d'autres s'infectent sur animaux virémiques (taux inférieur à 50 %) et sont capables de transmettre le virus jusqu'à plusieurs centaines de jours après l'exposition, par exemple après 10 mois pour *Carios coniceps*, 45 jours pour *Ornithodoros erraticus* [Vermeil et al., 1960], 57 à 224 jours pour *Ornithodoros moubata* [Lawrie et al., 2004], 418 jours pour *Argas reflexus*

[Hannoun et Rau, 1970], 20 jours pour *Argas arboreus* [Abbassy et al., 1993] et 35 jours pour *Carios capensis* [Hutcheson et al., 2005]. La conservation du VWN dans les tiques molles est cependant imparfaite. En effet, le titre viral ou le nombre d'individus infectés décroît avec le temps [Hutcheson et al., 2005]. Une transmission verticale n'est mise en évidence que chez *A. arboreus* [Abbassy et al., 1993]. La transmission est souvent mise en évidence par le biais d'une infestation massive [Whitman et Aitken, 1960], sauf chez certaines espèces : *C. coniceps* ou *A. reflexus* [Hannoun et Rau, 1970].

En revanche, la présence du virus dans les ectoparasites laisse supposer qu'il existe un risque de contamination des oiseaux par voie orale si les parasites infectés sont ingérés, par exemple lorsque les oiseaux se lissent les plumes [Anderson et al., 2003, Komar, 2003]. Il est donc possible que certaines espèces d'Argasidae puissent jouer le rôle de vecteurs du VWN dans des situations particulières de densités importantes d'oiseaux et de tiques. Un tel cycle oiseaux-tiques est proposé pour expliquer l'infection par VWN des populations de goélands argentés (*Larus argentatus*) infestés par *C. capensis* dans des îles de la mer Caspienne en l'absence de moustiques [Lvol, 1987].

Un cycle oiseaux-tiques est aussi suspecté en Israël dans des colonies de hérons garde-boeufs (37,8% de séroprévalence), où le VWN a été mis en évidence par RT-PCR chez *A. arboreus* (taux d'infection minimal 16/1000) [Mumcuoglu et al., 2005]. La longue vie des tiques molles, 10 à 20 ans selon les espèces [Rodhain F., 1985], pourrait permettre une persistance du VWN de façon localisée dans certains foyers.

En Tunisie une enquête entomologique a été réalisée après l'épidémie de 1997 [Bouatour et Rhaïem, 1998]. Elle a révélé la présence d'espèces des genres *Culex* (*Cx pipiens*, *Cx Theileri*, *Cx laticinctus*, *Cx perexiguus*) et *Aedes* (*A. detritus*, *A. caspius*, *A. vittatus*, *A. geniculatus* et *A. berlandi*) mais on n'a pas démontré leur rôle dans la transmission du VWN en Tunisie.

La compétence vectorielle est l'aptitude d'un arthropode à être infecté par un agent pathogène, à assurer son développement et à le transmettre efficacement à un nouvel hôte sensible [Rodhain et Perez, 1985]. Elle est évaluée au laboratoire et elle dépend de facteurs intrinsèques (génétiques) qui déterminent les préférences trophiques des moustiques et les barrières physiologiques qui conditionnent la capacité des moustiques à s'infecter oralement, à multiplier le virus dans l'intestin et à devenir infectant.

Elle dépend aussi des facteurs extrinsèques qui influencent les contacts hôte – vecteur comme la densité et l'âge de la population, les conditions environnementales (qui agissent sur l'agressivité et la longévité des vecteurs et sur la population d'hôtes) et en fonction de la période de l'année [Colton et Nasci, 2006]. De plus des barrières dose-et température-dépendantes réguleraient la sensibilité à l'infection orale et la capacité à transmettre le virus. De même, la quantité de virus dans la salive de moustiques [Colton et al., 2005] varie en fonction des populations [Baqar et al., 1993].

La souche virale peut également influencer sur la compétence vectorielle. En effet en fonction de la souche virale, le seuil d'infectivité ou la cinétique virale peuvent être modifiés [Reisen et al., 2006a].

La compétence vectorielle peut dépendre d'organismes symbiontes des moustiques tels que les bactéries du genre *Wolbachia*. Les études réalisées par Glaser ont montré que des moustiques infectés par cette bactérie résistaient mieux à l'infection par les arbovirus. Les résultats suggèrent que la bactérie *Wolbachia* peut réduire la compétence vectorielle pour *Cx. quinquefasciatus*, et potentiellement chez d'autres moustiques vecteurs infectés par *Wolbachia* [Glaser et Meola, 2010].

C'est *Aedes albopictus* qui a permis de démontrer dès 1943 la compétence vectorielle des moustiques pour le VWN. Par la suite, la compétence vectorielle a été étudiée en détail pour les espèces supposées impliquées dans les cycles de transmission, à savoir des espèces du genre *Culex*. Ainsi, il a été montré que *Cx. univittatus* possédait les caractéristiques d'un excellent vecteur du VWN : faible seuil d'infectivité et taux de transmission pouvant atteindre 100%.

D'autres espèces de *Culex* semblent être très compétentes, mais les données disponibles ne sont pas nombreuses. Il s'agit de *Cx. tritaeniorhynchus*, *Cx. antennatus*, *Cx. theileri* et *Cx. neavei*. La plupart des autres *Culex* présentent une compétence vectorielle moyenne, équivalente à celle de *Cx. pipiens* ou de *Cx. quinquefasciatus*.

La quasi-totalité des *Aedes* ont une compétence vectorielle faible voire très faible, sauf *Ae. albopictus* qui envahit rapidement le bassin méditerranéen et progresse vers le Nord de l'Europe. *Aedes trivittatus* présente une compétence vectorielle équivalente à *Cx. pipiens*. Seuls *Ae. atropalpus* et *Ae. japonicus* sont considérés comme de meilleurs vecteurs expérimentaux que *Cx. pipiens*, mais leur seuil d'infectivité n'a pas été déterminé. Les *Aedes* ont une bio-écologie très différente de celle des *Culex*. Les oeufs

sont pondus dans la boue et résistent pendant des mois ou des années à la dessiccation, en entrant en diapause. Lors de la remise en eau des gîtes de ponte (pluie, inondation), les œufs éclosent et les larves se développent en quelques jours. Des populations importantes de moustiques adultes peuvent alors piquer des hôtes éventuellement virémiques et amorcer un cycle qui est amplifié ultérieurement par des *Culex*.

La possibilité pour que le virus WN soit transmis directement d'un moustique à un autre, sans passage par la circulation sanguine de l'hôte, a été démontrée expérimentalement sur un modèle souris [McGee et al., 2007] et cela en évaluant l'effet de la distance et du temps du co-repas (co-feeding) entre deux moustiques (donneur infecté et receveur) sur la transmission non virémique (TNV). Pour qu'une TNV puisse se produire, il faut qu'un moustique receveur pique l'hôte à moins de 40 mm de la pique du moustique donneur infecté et cela pendant les 45 minutes qui suivent la pique. En outre, la TNV du VWN de *Cx quinquefasciatus* à *Ae. albopictus* a été observée [McGee et al., 2007]. Ce mécanisme avait été décrit pour les tiques [Lawrie et al., 2004]. Chez les oiseaux, la TNV du VWN serait favorisée par le fait que les moustiques se concentrent pour piquer leur hôte sur les parties du corps dénuées de plumes (contour de l'œil, base du bec, pattes).

Quand la densité de moustiques est importante, l'amplification du VWN pourrait donc être accélérée, grâce à une augmentation du nombre de vecteurs infectés, même si les hôtes présents sont de mauvais amplificateurs. Les oiseaux immunisés ou peu compétents et les différents hôtes considérés jusqu'à présent comme des culs de sac épidémiologiques pourraient donc en réalité permettre passivement l'amplification du VWN chez les vecteurs [Jourdain et al., 2007a].

L'étude de la transmission du VWN doit tenir compte de la biologie de la reproduction et de la nutrition des vecteurs ou cycle gonotrophique. Après l'accouplement des moustiques mâles et femelles, qui a lieu en général une seule fois après l'émergence de l'adulte, la femelle ténérante part à la recherche d'un hôte pour prendre un repas sanguin dont les protéines sont nécessaires à la maturation complète des œufs et à la ponte. Pendant la digestion du repas de sang, la femelle gorgée passe par plusieurs stades gonotrophiques définis selon le volume de l'abdomen occupé par les œufs et le sang. Après la ponte, la femelle part à la recherche d'un nouvel hôte pour effectuer un nouveau cycle, et ainsi de suite. L'incubation extrinsèque du virus s'effectue pendant la digestion si le premier repas était infectant. Si ce cycle est plus rapide que le cycle

gonotrophique, la femelle peut transmettre le virus lors du repas suivant. En fonction de l'espèce de moustique et des conditions de température, la période d'incubation extrinsèque et la durée du cycle gonotrophique sont variables. En effet plus la période d'incubation extrinsèque est courte, plus les chances de transmission du virus sont grandes.

Les espèces de moustique ont des spécificités d'hôtes plus ou moins strictes. On peut distinguer les espèces qui piquent préférentiellement une classe de vertébrés (oiseaux, mammifères ou batraciens et reptiles), de celles qui sont opportunistes [Clements, 1999]. Le choix de l'hôte est important pour la transmission vectorielle qui nécessite qu'un vecteur s'infecte sur un vertébré en phase de virémie et repique dans un repas ultérieur un vertébré naïf. Par définition, un vecteur doit montrer un comportement trophique lui permettant de piquer successivement ces deux hôtes. Les préférences trophiques sont les paramètres clefs à étudier pour comprendre dans quelle mesure les moustiques ornithophiles peuvent transmettre le VWN aux mammifères. En effet les études réalisées sur les repas de sang de *Cx. pipiens* ont montré que cette espèce est soit ornithophile [Apperson et al., 2002], soit opportuniste [Gingrich et Williams, 2005].

Les préférences trophiques pourraient être liées à un déterminisme génétique. En effet *Cx. pipiens* est une espèce réputée anautogène (il est nécessaire qu'elle prenne un repas sanguin pour effectuer chaque ponte), eurygame (besoin de beaucoup d'espace pour l'accouplement) et ornithophile, alors que *Cx. molestus* est une espèce autogène, sténogame (se reproduisant en vol) et anthropophile [Vinogradova, 2000]. Les différences de biologie entre ces deux moustiques seraient liées à une adaptation écologique rapide à des gîtes épigés pour *Cx. pipiens* et hypogés pour *Cx. molestus* [Barr, 1981, Harbach et al., 1984]. Aux États-Unis, des auteurs ont montré la présence d'hybrides entre ces deux espèces qui expliqueraient la transmission intense du VWN [Fonseca et al., 2004]. Les hybrides piqueraient de façon indifférenciée les oiseaux et les hommes, ce qui n'est toutefois pas toujours confirmé par les études de préférences trophiques [Spielman et al., 2004].

Les préférences trophiques pourraient varier en fonction d'un déterminisme environnemental. Une variation des préférences trophiques (d'ornithophiles à mammophiles) au cours de la saison a été décrite pour *Cx. pipiens* au Colorado [Tempelis et al., 1967] ou pour *Cx. nigripalpus* en Floride [Edman et Taylor, 1968]. Il est possible

que la température ait une influence sur le comportement trophique. En effet, des nuisances dues à *Cx pipiens* sont constatées en milieu rural et en plein jour pendant des périodes de fortes chaleurs dans le sud de la France [Balenghien et al., 2006]. Dans la même région, la teneur en matière organique des gîtes larvaires de *Cx pipiens* est positivement corrélée à la mammophilie des adultes issus de ces gîtes [Gabinaud et al., 1985].

Les moustiques peuvent également être des réservoirs du VWN car les femelles infectées peuvent transmettre le virus aux générations suivantes, par voie trans-ovarienne. Plus généralement, la survie à l'hiver en zone tempérée ou à la saison sèche en région chaude de différentes formes infectées (œufs, larves ou adultes) peut être à l'origine d'un redémarrage du cycle à la saison suivante [Baqar et al., 1993]. Par exemple, le taux d'infection par le VWN a été de 2,4 femelles infectées / 1000 femelles de *Culex* recueillies à Fort Totten, New York, en janvier et février [Nasci et al., 2000]. Cela suggère que la transmission trans-générationnelle du VWN est un moyen important pour permettre à ce virus de persister pendant hiver dans les climats tempérés (les femelles de *Cx pipiens* survivent à l'hiver sans prendre un repas de sang).

3.1.2 Les hôtes vertébrés du virus West Nile

Les oiseaux sauvages sont porteurs de nombreux parasites (virus, bactéries, champignons, macroparasites) dont certains sont des pathogènes transmissibles à l'Homme (zoonoses) ou aux animaux domestiques [Janovy, 1997, Moutou, 1997, Nuttal, 1997, Friend et al., 2001]. En effet en quelques semaines, des milliards d'oiseaux transitent chaque année d'un continent à l'autre pour rejoindre, selon la saison, leur site d'hivernage ou de nidification [Alerstam, 1990]. Au cours de ces déplacements, ils véhiculent tout un panel d'agents pathogènes susceptibles de conduire à l'émergence de maladies dans des zones jusqu'alors indemnes [Comstedt et al., 2006, Hubalek, 2004, Moutou, 2001, Olsen et al., 2006, Walendström et al., 2002].

Le VWN est bien adapté aux oiseaux, chez qui l'infection entraîne peu de trouble ou de mortalité. La virémie est plus longue et plus forte que chez les mammifères, mais son amplitude et sa durée varient avec les espèces dont quelques-unes seulement sont susceptibles de constituer des réservoirs [Komar, 2003]. En Egypte, dans les années 50, la présence d'anticorps contre le VWN a été détectée chez 40% des 420 espèces

d'oiseaux examinés, principalement chez des corvidés ou chez des moineaux, et des manifestations neurologiques ont été observées chez des pigeons [Lvov et al., 2004, Taylor et al., 1956].

En Europe Sud et de l'Est, les études réalisées essentiellement dans les années 60 et 70, ont montré la présence d'anticorps chez différentes espèces d'oiseaux sauvages, migrateurs ou non. Des isollements réalisés à partir d'oiseaux sont rapportés chez la tourterelle des bois (*Streptopelia turtur*) ou chez la fauvette épervière (*Sylvia nisoria*), en Slovaquie, à Chypre, ainsi qu'en Russie et en Ukraine. Une étude américaine montre que ce sont surtout les passereaux qui participent à la propagation du virus, même si certaines variétés issues d'autres ordres peuvent aussi le transmettre via des piqûres de moustiques. C'est le cas des oiseaux aquatiques (charadriiformes), des autours des palombes, des aigles, des vautours et d'autres espèces similaires (falconiformes) et des chouettes et des hiboux (strigiformes) [Irma Glatt, 2012].

Lors de l'épidémie de WN de 1974 en Afrique du Sud, plus de 50% des 322 oiseaux étudiés étaient porteurs d'anticorps, principalement des tourterelles, grives, moineaux et cardinaux [Hubalek, 2000, Zeller et Murgue, 2001]. En 1998, le virus a été isolé chez des cigognes mortes en Israël [Malkinson et al., 2002]. Aux Etats-Unis, en 1999, l'introduction du VWN a entraîné la mort de divers oiseaux (flamants, faisans, canards, cormorans, chouettes, aigles) des zoos du Bronx et du Queens à New-York ainsi que celle de plusieurs milliers d'oiseaux sauvages, essentiellement des corvidés [Garmendia et al., 2000], alors que les poulets, pigeons et moineaux sont apparus moyennement sensible [Komar et al., 2003]. Il est cependant difficile de préciser quelles sont les espèces d'oiseaux qui pourraient être incriminées dans la diffusion du virus. Des études d'inoculation expérimentales par le VWN lignage 1 (souche NY99) chez des rapaces ont montré que les crécerelles d'Amérique (*Falco sparverius*), l'aigle royal (*A. chrysaetos*), la buse à queue rousse (*Buteo jamaicensis*), la chouette effraie (*Tyto alba*), et le grand-duc d'Amérique (*Bubo virginianus*) [Komar et al., 2003] sont sensibles à l'infection et excrètent efficacement le virus par les voies oro- pharyngé et fécale.

D'autre étude on été faite en inoculant par voie sous-cutanée des virus des lignages 1 et 2 (souches 99 NY et Austria, respectivement) à des faucons gerfaut (*Falco rusticolus*) et des faucons hybrides (*F. rusticolus* avec *F. cherrug* et *F. rusticolus* avec *F. peregrinus*) on montré les effets dévastateurs de l'infection par le VWN chez les faucons,

indépendamment du lignage et de la dose du virus utilisée. Les études ont montré aussi que, chez les faucons, la virémie est relativement longue et la charge virale est élevée. Les faucons peuvent être considérés comme compétents pour le VWN et de très bons hôtes amplificateurs. Ils pourraient jouer un rôle dans la propagation du virus car ils migrent sur de longues distances [Ziegler et al., 2012].

Le mode principal d'exposition des oiseaux est la piqûre par un moustique infecté. Cependant des cas de transmission directe par voie alimentaire, oro-fécale ou par contacts directs entre oiseaux ont été décrits expérimentalement [Genain et al., 2010]. Des travaux de modélisation ont montré que cette transmission directe pourrait être nécessaires pour expliquer les phases d'amplification virale.

Outre les oiseaux, d'autres espèces sont susceptibles d'être des réservoirs, comme les reptiles. En effet, des inoculations expérimentales ont confirmé que les alligators (*Alligator mississippiensis*) étaient sensibles à l'infection par le VWN, et pouvaient développer des niveaux de virémie très élevés susceptibles d'infecter des moustiques (*Culex quinquefasciatus*), et développaient parfois des signes cliniques [Klenk et Komar, 2003]. Par contre, l'effet du VWN chez les alligators sauvages est inconnu. Une enquête sérologique réalisée en Floride a montré des faible séroprévalence [Jacobson et al., 2005b]. Cependant les alligators peuvent être considérés comme des hôtes amplificateurs pour le VWN [Jacobson et al., 2005a].

Des inoculations expérimentales par différentes voies chez la Couleuvre rayée (*Thamnophis sirtalis*) on été réalisées : 56% des serpents inoculés par voie sous-cutanée sont devenus virémiques. Les serpents inoculés par la voie parentérale sont morts et le virus a été trouvé avec un titre élevé dans les organes. En revanche, les couleuvres inoculées par la voie digestives n'ont pas développé une virémie, mais l'ARN viral a été détecté dans des écouvillons cloacaux. Puisque l'infection orale par le VWN est possible chez les oiseaux prédateurs, l'ingestion de serpents infectés pourrait entraîner leur infection [Steinman et al., 2006].

Le rôle de réservoir des amphibiens a été évoqué suite des inoculations expérimentales chez la grenouille des lacs, *Rana catesbeiana* [Klenk et Komar, 2003] et chez la grenouille rieuse *Rana ridibunda*. L'ARN viral a été détecté à des niveaux élevé dans le sang et dans les écouvillons cloacaux et oraux.

Plusieurs études épidémiologiques ont montré que les chiens en Italie [Blackburn et al., 1989, Bonaduce et al., 1977], en Turquie [Ozkul et al., 2006], en Afrique du Sud [Blackburn et al., 1989], et aux Etats-Unis [Buckweitz et al., 2003, Kile et al., 2005] pouvaient être séropositifs pour le VWN. Dans le même temps, il a été observé que les chats aux Etats-Unis et en Turquie portaient des anticorps contre le VWN [Kile et al., 2005, Ozkul et al., 2006]. En plus des données sérologiques, l'infection par le VWN a été confirmée chez ces deux espèces par isolement du virus, par les examens histopathologiques et par l'inoculation expérimentale [Austgen et al., 2004, Buckweitz et al., 2003, Cannon et al., 2006, Read et al., 2005]. Des études ont été menées pour évaluer la possibilité d'utiliser ces animaux comme des sentinelles dans la surveillance du VWN. Aux USA, la séroconversion a ainsi été détectée 6 semaines avant l'apparition du premier cas humain [Resnick et al., 2008a].

Par analogie avec les vecteurs, la notion de compétence d'hôte a été suggérée. Elle correspond à la capacité d'une espèce hôte à être infectée et à présenter l'agent infectieux à des vecteurs [Komar et al., 1999]. On peut ainsi considérer qu'une espèce d'oiseau présentant une virémie forte et durable associée à une faible mortalité possède une compétence d'hôte élevée. En revanche, une espèce présentant une forte virémie associée à une forte mortalité n'est peut-être pas plus compétente qu'une espèce présentant une virémie modérée avec aucune mortalité. Par ailleurs, la compétence d'hôte est difficile à extrapoler car elle peut varier entre individus d'une même espèce en fonction de divers facteurs [Jourdain et al., 2007a].

Les migrations d'oiseaux ont une importance considérable dans la dissémination du VWN. Un de ces flux englobe la Méditerranée, et par conséquent la Tunisie. Lors de leurs déplacements de l'Europe vers l'Afrique et inversement, un grand nombre d'oiseaux migrants font escale dans certains points dans le pays, essentiellement sur les côtes (région du Sahel). Pour une traversée rapide de la Méditerranée, ces oiseaux passent de la Tunisie vers l'Italie puisque moins de 150 km séparent la pointe du Cap Bon de la Sicile.

Les oiseaux migrants ont été depuis longtemps suspectés comme des hôtes permettant l'introduction du VWN dans diverses régions. Les épidémies de FWN dans les régions tempérées surviennent habituellement en fin d'été, généralement à proximité de zones humides où sont réunies de grandes concentrations d'oiseaux et de

vecteurs. L'importance des oiseaux migrateurs dans la propagation de VWN à partir de leurs sites d'hivernage d'Afrique sub-saharienne vers les zones de reproduction en Afrique du Nord et en Europe (Figure 11), et l'amplification de la circulation du virus par les oiseaux résidents, a été démontré par des études phylogéniques (Figure 12) [Hubálek et Halouzka, 1999, Jourdain et al., 2007a].

Le rôle des oiseaux migrateurs dans l'introduction du VWN en Europe et le bassin méditerranéen (Tableau 1) est évoqué dans de nombreuses études en Espagne [Figuerola et al., 2007, Figuerola et al., 2008, Jiménez-Clavero et al., 2008], Israël [Malkinson et al., 2002], Pologne [Hubálek et al., 2008], Roumanie [Nicolescu et al., 2009], République tchèque [Hubálek et al., 2008] et Portugal [Parreira et al., 2007].

Une étude sérologique comparative entre les espèces migratrices (courte distance ou trans-saharienne) et résidentes a été réalisé en 2004, près de Séville [López et al., 2008]. Elle a montré que des anticorps anti-VWN étaient présents chez 3 espèces d'oiseaux migrateurs qui parcourent de longues distances au-dessus du Sahara (*Lanius senator*, *Phoenicurus phoenicurus*, *Sylvia borin*) et une espèce d'oiseaux résidents (*Turdus merula*). D'autre part, le génome du VWN a été détecté par RT-PCR chez des pies (*Pica pica*), des corneilles (*Corvus corone*) et le pigeon biset (*Columba livia*).

Ces observations confirment l'importance des oiseaux migrateurs dans l'introduction de VWN, mais également le rôle des espèces résidentes dans la transmission locale du VWN. Les migrations entraînent des modifications physiologiques importantes chez les oiseaux. L'effort déployé par le migrateur pourrait induire un état d'immunodépression susceptible de favoriser une réplication du virus, avec comme conséquence une virémie à titre élevé et de durée allongée, permettant ainsi l'infection des vecteurs culicidiens. L'infection de l'oiseau devrait avoir lieu juste avant la migration, avec la phase d'incubation pendant le voyage et la phase infectieuse lors de l'arrivée.

Espèces		Pays
Crabier chevelu	<i>Ardeola ralloides</i>	Sud de l'Ukraine
Ibis falcinelle	<i>Plegadis falcinellus</i>	Sud de la Russie
Sarcelle d'été	<i>Anas querquedula</i>	Sud de l'Ukraine
Foulque macroule	<i>Fulica atra</i>	Sud de l'Ukraine
Chevalier culblanc	<i>Tringa ochropus</i>	Slovaquie
Vanneau huppé	<i>Vanellus vanellus</i>	Slovaquie, sud de l'Ukraine
Mouette rieuse	<i>Larus ridibundus</i>	Slovaquie, Italie
Tourterelle des bois	<i>Streptopelia turtur</i>	Slovaquie
Corneille noire	<i>Corvus corone</i>	Sud de la Russie, Italie
Corbeau freux	<i>Corvus frugilegus</i>	Sud de l'Ukraine
Etourneau sansonnet	<i>Sturnus vulgaris</i>	Sud de l'Ukraine, Italie
Pie bavarde	<i>Pica pica</i>	Italie, Grèce
Geai des chênes	<i>Garrulus glandarius</i>	Italie
Canard colvert	<i>Anas platyrhynchos</i>	Italie
Pigeon biset	<i>Columba livia</i>	Italie
Chouette chevêche	<i>Athene noctua</i>	Italie
Autour des palombes	<i>Accipiter spp.</i>	Hongrie, Autriche

Tableau 1. Espèces d'oiseaux sauvages chez lesquelles le virus West Nile a été mis en évidence en Europe [Angelini et al., 2010, Calistri et al., 2010, Hubalek, 2000, Monaco et al., 2010, Valiakos et al., 2011]

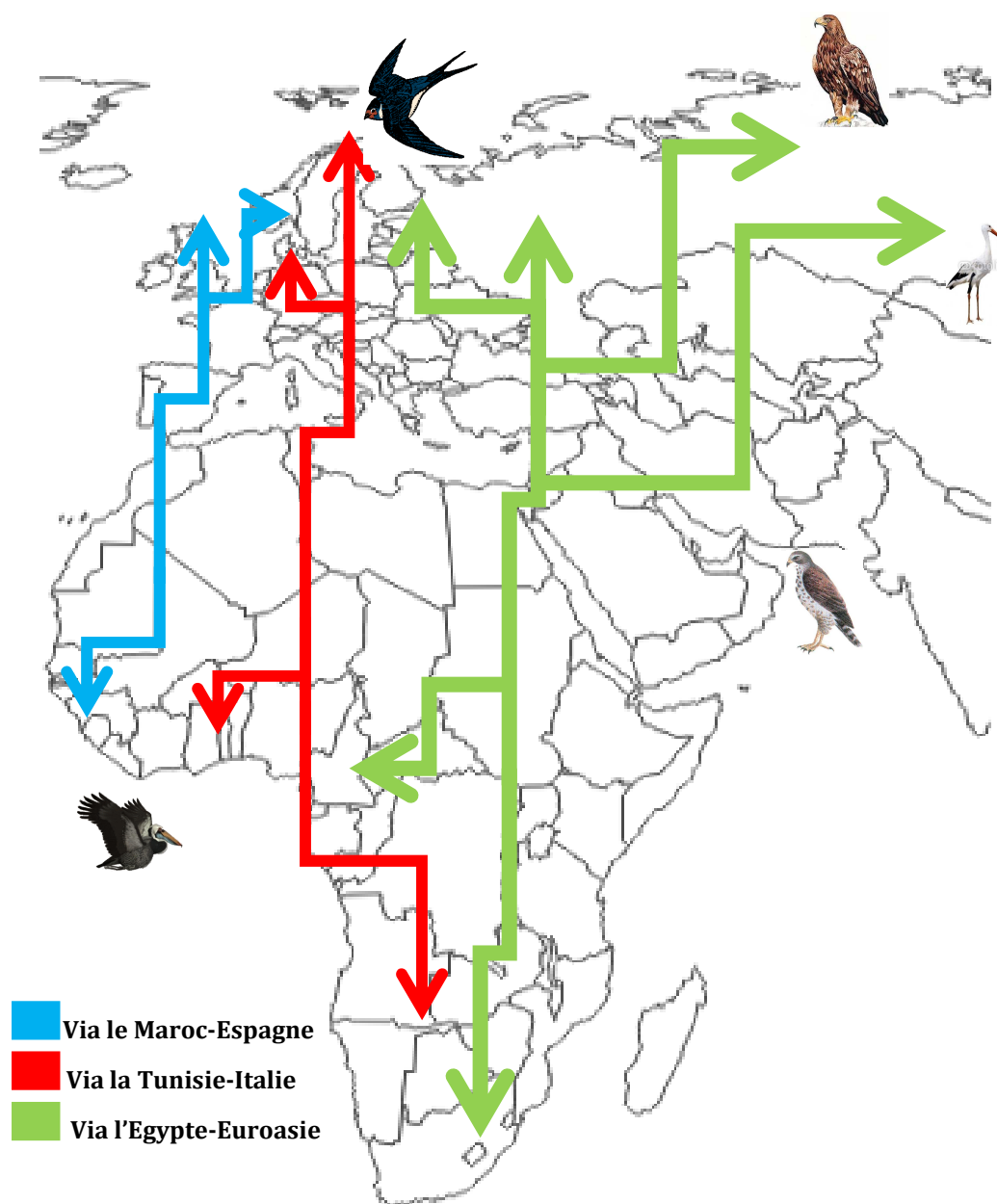


Figure 11. Voies de migration des oiseaux entre Afrique, Europe et Asie

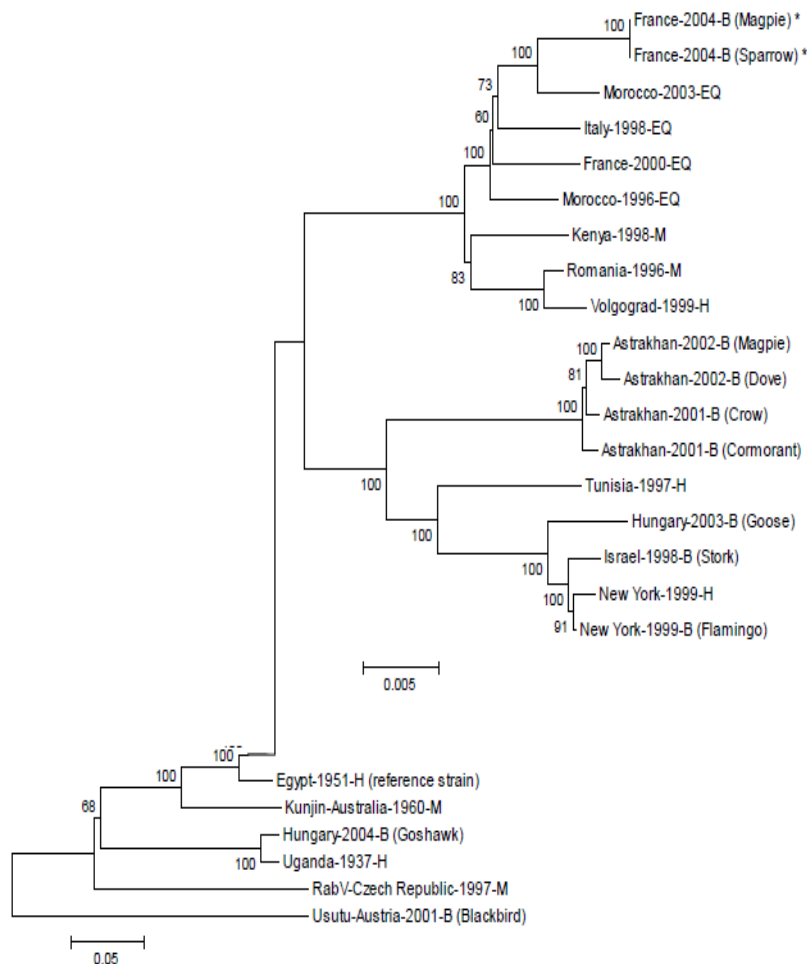


Figure 12. Arbre phylogénétique basé sur la séquence complète de différents virus West Nile. EQ = souche équine, H = souche humaine, M = souche isolée sur moustique, B = souche isolée sur oiseau [Jourdain et al., 2007a]

Malgré la surface réduite de la Tunisie, la richesse spécifique des oiseaux signalés sur le territoire national est voisine de 365, ces espèces étant réparties inégalement dans 64 familles [El hili, 2005]. Cette richesse aviaire résulte probablement de la diversité climatique de la Tunisie qui va de climat frais et humide au Nord, jusqu'au climat désertique saharien au Sud. La diversité des écosystèmes humides (naturels et artificiels, permanents et temporaires...) est également élevée. Par ailleurs, les oiseaux migrateurs empruntent trois voies essentielles, le Nord-Ouest, le Cap bon au Nord-est et par l'Est sur une zone située entre Sousse et Sfax (Figure 13).

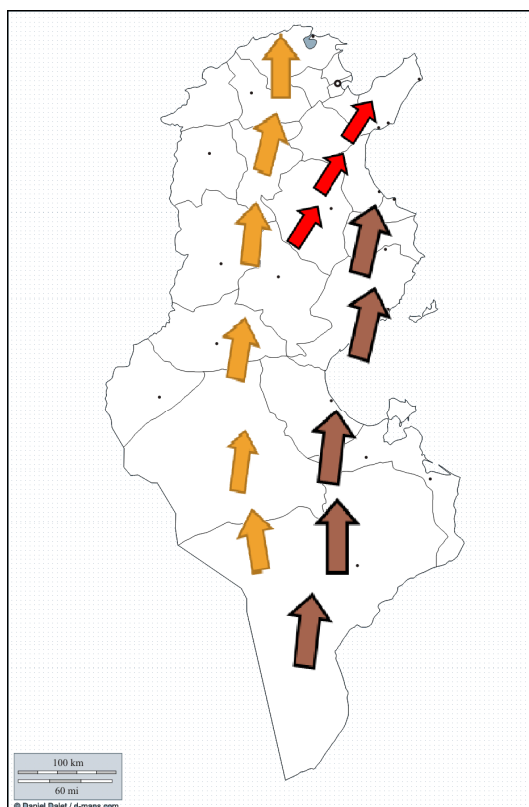


Figure 13. les voies de migration des oiseaux en Tunisie

Par ailleurs, les recensements effectués dans le cadre d'inventaires internationaux sur le pourtour méditerranéen ont abouti à classer les espèces d'oiseaux migrateurs rencontrées en Tunisie en 3 catégories [El hili, 2005]:

- Les oiseaux migrateurs hivernants : 144 espèces passent l'hiver en Tunisie. Les premières arrivées ont lieu vers fin août ; le pic est atteint en décembre et les départs commencent début mars. Parmi ces espèces, on trouve les canards, oies, grues cendrées (*Grus grus*), et les étourneaux.
- Les oiseaux nicheurs comptent 56 espèces. Ils nichent au printemps en Tunisie. Ils arrivent à la mi-mars pour repartir vers fin août, et hivernent au sud du Sahara. Ce sont par exemple la cigogne blanche, la tourterelle des bois, et certains rapaces.
- Les oiseaux migrateurs de passage fréquentent la Tunisie lors de la migration d'automne d'Europe et d'Asie vers l'Afrique, ou de l'Afrique vers l'Asie et l'Europe au printemps. Si certains ne font que survoler la Tunisie en n'y séjournant que quelques jours selon les conditions météorologiques, d'autres restent dans le pays plusieurs semaines. C'est le cas de certaines espèces de canards. Ces oiseaux suivent la dorsale tunisienne jusqu'au Cap Bon où ils franchissent le détroit de Sicile à partir d'El

Haouaria. Certains d'entre eux traversent la Méditerranée en diagonale à partir de Gabès et de Kerkennah. Les zones humides accueillent les oiseaux d'eau de l'extrême nord (barrage de Sidi El Barrak) à l'extrême sud (zone humide d'el Borma).

Les opérations de baguage effectuées en Tunisie montrent que les oiseaux migrateurs proviennent essentiellement d'Europe centrale, d'Europe de l'Est, de Russie et d'Asie centrale. Les oiseaux migrateurs hivernants abordent notre pays sur un front très large commençant souvent par les îles : de La Galite, de Zembra, de Kerkennah, et de Djerba, puis ils se répartissent selon les espèces sur tout le territoire.

Le recensement des oiseaux aquatiques effectué en 2009 (Figure 14) a montré la présence de 300.000 individus de limicoles avec environ 33 espèces hivernent chaque année, 250.000 canards, oies et foulques, 25.000 flamants roses dont la nidification dépend essentiellement des conditions pluviométriques et de la mise en eau des chotts et grands Sebkhass du sud [El hili, 2005].

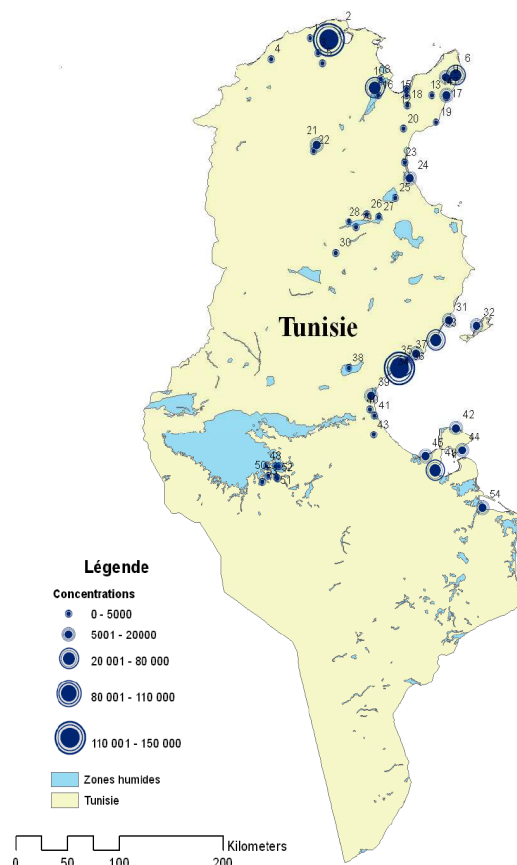


Figure 14. Principales concentrations d'oiseaux d'eau du recensement de janvier 2009
[Azafzaf et Feltrup-azafzaf, 2009]

En Tunisie, les oiseaux migrateurs ont été soupçonnés d'être responsables de l'introduction du VWN dans le pays pour les raisons suivantes :

- Les épidémies dues au VWN se produisent généralement en fin d'été ou au début de l'automne, coïncidant ainsi avec l'arrivée d'un grand nombre d'oiseaux migrateurs et les pullulations des moustiques après les pluies d'automne.
- Elles touchent souvent les humains vivant près des zones humides où il y a une grande concentration d'oiseaux et de nombreux moustiques ornithophiles.
- Certains moustiques ornithophiles chez lesquels le VWN a été isolé (*Culex univittatus* au Moyen-Orient et *Cx pipiens* en Europe) ont été identifiés en Tunisie et sont abondants.

Il ne faut pas négliger le rôle des oiseaux locaux dans l'amplification du VWN malgré le manque d'investigations faites à ce sujet. En Italie, en 2008, une enquête a montré qu'un l'entretien de la transmission du virus. Ces résultats nous incitent à réaliser des enquêtes similaires en Tunisie pour essayer de comprendre le rôle des oiseaux migrateur et résident dans l'épidémiologie du VWN dans ce pays.

4 Facteurs écologiques

La Tunisie est un pays d'interface d'une part entre l'Europe et l'Afrique et d'autre part entre le Machrek (Orient arabe) et le Maghreb (occident arabe). Malgré sa faible superficie (164.150 km²), c'est un pays largement ouvert sur la Méditerranée, avec 1.300 km de côtes et un vaste plateau continental de près de 80.000 km². La situation géographique de la Tunisie confère à ses écosystèmes une large interdépendance avec l'ensemble de la région méditerranéenne.

Le pays est riche en contrastes. Il englobe de vastes zones montagneuses au Nord et à l'Est (chaîne de l'Atlas). C'est aussi le pays des hautes steppes arides drainées par des oueds endoréiques et des basses steppes semi-arides côtières s'achevant par un littoral bas, peu accidenté et se prolongeant en mer par une vaste plate-forme continentale. Sa zone saharienne abrite les Chotts qui sont des vastes lacs naturels riches en sels, situés au-dessous du niveau de la mer et s'étendant des frontières de la Libye à celle de l'Algérie.

La pluviométrie moyenne annuelle est variable selon les étages bioclimatiques (Figure 15) et la saison :

- Au Nord : 800 mm (étage humide), 600 mm (étage subhumide), 450 mm (étage semi-aride)
- Au Centre : 100 à 250 mm (étage aride)
- Au Sud : 50 mm (étage désertique)

A cette grande diversité de reliefs et de climats correspondent une diversité de réseaux hydrographique et hydrogéologique et une diversité de sols créant ainsi des conditions d'existence de biotopes les plus variés. La Tunisie dispose d'un réseau hydrographique à répartition non uniforme et dont l'importance diminue du Nord vers le Sud : le Nord (80% des eaux de surface), le centre (15%) et le Sud (5% malgré son étendue).

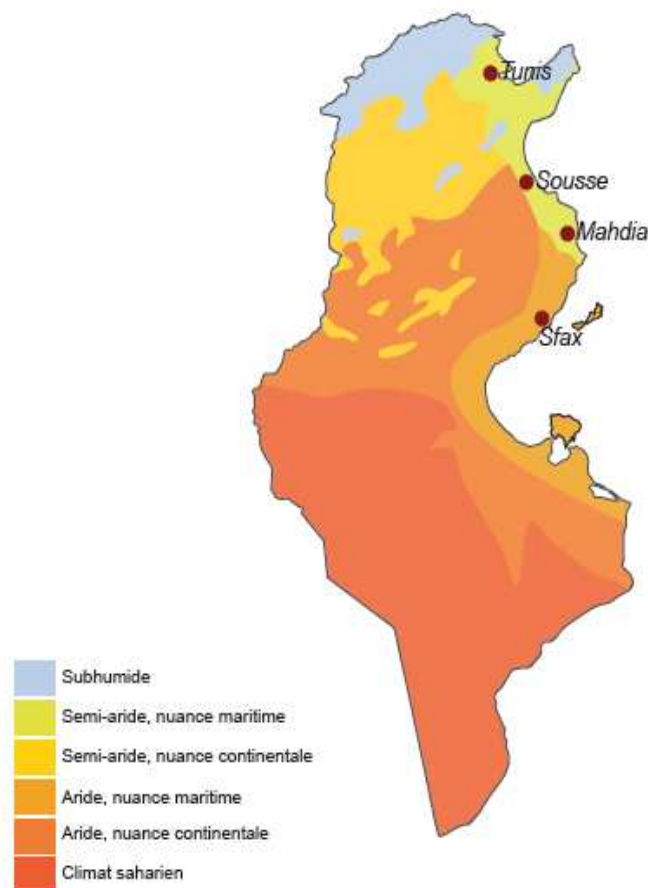


Figure 15. Etages climatiques de la Tunisie [Paute, 2008]

4.1 Classification des zones humides de Tunisie

Les zones humides tunisiennes sont très diversifiées. Elles comprennent :

- Les garaas ou lac sont des étendues d'eau douce situées à l'intérieur du pays. Elles peuvent être temporaires (Gaaret el Mabtouh) ou permanentes (Gaaret Ichkeul). Elles sont généralement localisées dans le nord du pays où la pluviométrie est importante. Elles abritent des populations importantes d'oiseaux migrateurs : 150.000 par an pour le Lac d'Ichkeul.
- Les marais d'eau douce ou saumâtre sont associés à des inondations fréquentes ou à l'accumulation plus ou moins importante de masses d'eau et des eaux de ruissellement.
- Les tourbières sont des accumulations de végétaux morts dans un milieu inondé fortement acide et déficitaire en oxygène avec une décomposition très lente.
- Les lagunes sont des zones humides d'eaux salées, situées du nord au sud du pays, de profondeurs variables et reliées à la mer par un ou plusieurs chenaux. Leur superficie varie de quelques hectares à plusieurs milliers d'hectares. On y trouve surtout les avocettes, les échasses blanches et les sternes.
- Les marais intertidaux sont des espaces au bord de la mer qui se découvrent à marée basse. Ils sont souvent bordés par une plage sablonneuse de largeur variable. Ils sont partiellement recouverts d'une végétation composée de zostère qui forme une aire de nourrissage pour les oiseaux limicoles. Ils s'étendent de Sfax à Djerba.
- Les sebkhas sont des dépressions qui retiennent l'eau, généralement saumâtre ou salée sur une superficie variant de quelques centaines à quelques milliers d'hectares. Elles sont présentes du nord au sud (sebkhas de Sijoumi, Kelibia...). Ce sont des lieux de nidification pour le grèbe huppé, le canard colvert, la sarcelle marbrée...
- Les chotts sont de larges dépressions peu profondes, couvrant des milliers d'hectares irrégulièrement inondées. Pendant la saison sèche, une croûte de sel se forme en surface. Ils se situent à la limite nord du Sahara (Chott El Jérid...). Les chotts et les sebkhas présentent des conditions idéales pour la nidification des flamants roses.

De nombreuses zones humides ont été identifiées : 54 sebkhas, 31 Garaats, 17 chotts, une tourbière, 28 retenues de barrages, 64 oueds, 37 étangs, 14 marais intérieurs, 4 marais côtiers, 16 plages, 15 lacs. Ces zones humides abritent plus de 300 espèces végétales et

140 espèces d'oiseaux. Elles sont réparties sur tout le territoire avec une prépondérance dans le Nord-Ouest et le Centre-Est (Tableau 2).

TYPES	REGIONS				TOTAL	%
	NORD OUEST	NORD EST	CENTRE	SUD		
Oueds	25	10	19	10	64	27
Sebkhas		13	20	21	54	23
Garaa	9	5	12	5	31	13
Marais intérieurs	10	1	3		14	6
Marais côtiers			4		4	2
Chotts			14	3	17	7
Iagunes	4	4	2	3	13	6
Oasis				6	6	3
Sources naturelles	3	1	1		5	2
Tourbières	1				1	0
Barrages	11	13	4		28	12
TOTAL	63	47	79	48	237	100

Tableau 2. Distribution des zones humides en Tunisie [El Ghouli, 2009]

4.2 Les sites Ramsar en Tunisie

La Convention de Ramsar, (Convention relative aux zones humides d'importance internationale) est un traité international adopté le 2 février 1971 pour la conservation et l'utilisation durable des zones humides. En Tunisie, 20 sites ont été identifiés dans le cadre de cette convention (Figure 16). En effet, selon les conditions climatiques locales, leur capacité d'accueil peut dépasser 20 000 oiseaux [Hamdi et Chard Cheikhrouha, 2011]

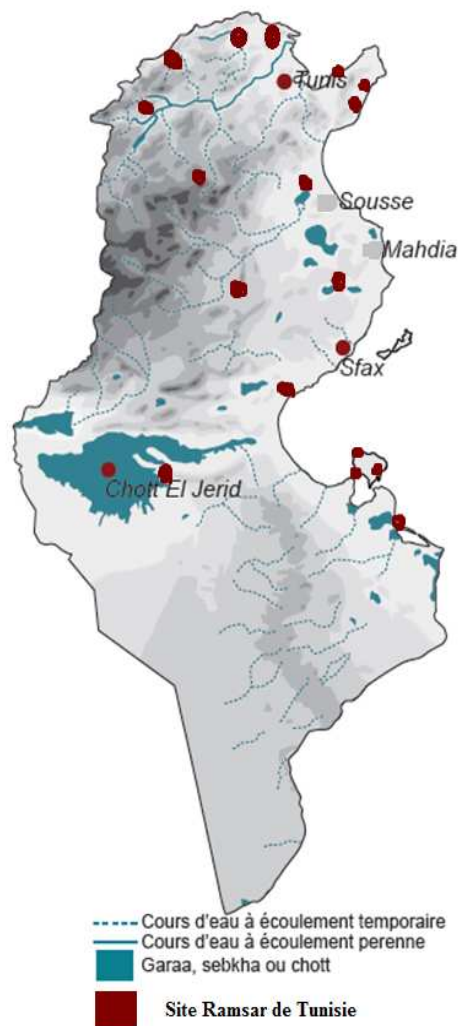


Figure 16. Les zones humides et les sites Ramsar de Tunisie [Paute, 2008]

4.3 Les facteurs anthropiques menaçant les zones humides

Les zones humides tunisiennes sont d'une grande importance pour l'hivernage et la conservation des oiseaux aquatiques. Toutefois leur superficie a diminué suite aux travaux de drainage et au développement agricole et industriel. Ainsi, entre 1981, et 1997 la superficie de ces milieux naturels a régressé de plus de 15% [Hughes et al., 1997]. À cette perte quantitative s'ajoute une perte qualitative susceptible d'engendrer des dégâts sur le peuplement d'oiseaux d'eau. La plupart de ces milieux naturels présentent une altération de leur valeur biologique suite à la construction de barrages autour de leurs bassins versants. À ces constructions hydro-agricoles s'associe l'activité cynégétique qui exerce une pression croissante sur les populations aviaires, notamment par le braconnage. L'ensemble est relayé par des activités touristiques en plein essor qui ciblent surtout les milieux côtiers. La conséquence de ces modifications est

l'anthropisation de l'habitat des oiseaux d'eau et la perte des caractéristiques initiales qui font l'originalité des zones humides au profit de nouveaux critères moins naturels [Davidson et Evans, 1986]. Pour le risque de transmission du VWN, cette anthropisation augmente le contact entre l'homme (et ses commensaux comme les équidés) et les populations de moustiques potentiellement infectés, d'autant que la diminution de la qualité des eaux de surface diminue leur biodiversité et favorise le développement d'espèces adaptées aux eaux « sales », telles que *Culex pipiens*. D'autre part, la réduction de la biodiversité aviaire liée aux aménagements hydro-agricoles favorise la diminution de l'effet de dilution, et augmente le risque épidémique.

4.4 Facteurs écologiques et activité du virus West Nile

Plusieurs facteurs environnementaux et écologiques sont responsables de la persistance de VWN et l'augmentation de l'activité virale. Il s'agit le plus souvent de facteurs climatiques qui peuvent influencer indirectement la dissémination virale en modifiant la physiologie des insectes, leur densité et le cycle extrinsèque du VWN, ainsi que la diversité et l'abondance des hôtes vertébrés. On peut citer entre autres :

- L'élévation des températures entraînant un développement plus rapide des moustiques et un raccourcissement du cycle trophogonique avec une production plus importante d'œufs en un laps de temps plus court [Epstein, 2001]
- Les inondations secondaires à de fortes pluies ou la présence d'eaux stagnantes constituant des terrains propices à la ponte des moustiques avec augmentation de la population vectorielle.

En période de sécheresse, les eaux stagnantes deviennent plus riches en matières organiques en décomposition, favorables au développement larvaire de certaines espèces de moustiques, et défavorables à leurs prédateurs tels que les grenouilles et les libellules. Les oiseaux sont dans le même temps forcés à se concentrer autour de ces points d'eau facilitant ainsi le cycle de transmission et d'amplification virale. La migration des oiseaux infectés favorise la dissémination du VWN à longue distance [Epstein, 2001].

4.5 Distribution des vecteurs potentiels du virus West Nile selon les facteurs écologiques

D'après les rares études entomologiques réalisées en Tunisie sur la distribution des vecteurs potentiels du VWN, on peut dégager quelques grandes tendances.

- *Cx pipiens* supporte les eaux saumâtres : la salinité des gîtes larvaires varie de 0,24 à 2,75 g / L. Sa respiration aérienne lui permet de coloniser des milieux pauvres en oxygène. Ses facultés d'adaptation lui permettant de coloniser différents types de gîtes. Elle est ainsi très répandue en Tunisie. Les plus grandes densités sont retrouvées dans les eaux stagnantes et riches en matières organiques [El Ghoul, 2009].
- *Cx theileri* occupe des gîtes très divers ce qui explique sa répartition sur tout le territoire tunisien. Cette espèce supporte les eaux saumâtres (0,5 à 11 g / L)
- *Cx laticinctus* est très répandu en Tunisie. Ce moustique s'accommode de divers types de gîtes y compris en eau saumâtre. Les adultes de cette espèce sont observés fréquemment d'août à octobre. C'est une espèce zoophile exophage [Bouatour et Rhaïem, 1998]
- *Cx perexiguus* occupe les gîtes à eau douce et les mares salées avec ou sans végétation. Les adultes sont actifs de septembre à novembre. C'est une espèce antro-po-zoophile : elle se nourrit préférentiellement sur l'homme ou les animaux
- *Aedes detritus* est une espèce halophile occupant les marais salés le long du littoral tunisien. C'est une espèce fréquente et abondante qui pique l'homme pendant la journée [Bouatour et Rhaïem, 1998].
- *Aedes caspius* a la même écologie que l'espèce précédente et occupe le même biotope et peut aussi être rencontrée dans des régions continentales (Sidi Bouzid, Tozeur) [Bouatour et Rhaïem, 1998].
- *Aedes vittatus* est collecté uniquement dans la région de Meknassi
- *Aedes geniculatus* et *Aedes berlandi* sont des espèces arboricoles strictes, on les rencontre dans la région de Ain Draham

En conclusion de cette section, différentes régions de Tunisie constituent par leur climat, la nature de leur sol, la présence de zones humides et de végétation, un milieu favorable pour le développement et la pullulation des vecteurs potentiels du VWN. Elles

constituent un milieu favorable pour la rencontre avec les hôtes aviaires impliqués dans le cycle du virus.

L'activité saisonnière et périodique du VWN en Tunisie est probablement liée aux conditions climatiques et environnementales qui contrôlent les possibilités de développement de populations de moustiques et leur contact avec des populations d'oiseaux permettant de nouvelles introductions virales à l'occasion des migrations, et l'amplification de la circulation virale.

5 Infection de l'homme et des équidés

5.1 L'infection humaine par le virus West Nile

Chez l'homme, l'infection est le plus souvent asymptomatique (80 %) et ne motive pas une consultation médicale. Les manifestations cliniques sont constituées dans la majorité des cas par un syndrome pseudogrippal (« grippe estivale ») faisant suite à une courte période d'incubation de quelques jours avec une résolution sans séquelle. Une faible proportion (environ 1%) des personnes ayant des signes cliniques présentent des formes graves avec des manifestations neurologiques. La mortalité liée à ces formes graves est variable et peut être estimée aux alentours de 10 % [Gallian et al., 2005]. La fréquence des formes graves et un mauvais pronostic vital sont associés à l'âge (> 65 ans) et à l'état du système immunitaire du patient [Weiss et al., 2001]. L'homme est un hôte accidentel du VWN et un cul-de-sac épidémiologique car le taux de réplication du virus dans le sang est insuffisant pour infecter de nouveaux moustiques indemnes lors de leur repas de sang.

Environ 80% des infections de l'homme par le VWN sont asymptomatiques. La maladie s'exprime sous la forme d'un syndrome grippal bénin, caractérisé par une fièvre d'apparition brutale, qui dure 3 à 5 jours, avec des maux de tête, une irritation de la gorge, une myalgie, des arthralgies, de la fatigue, une conjonctivite et une douleur rétrobulbaire [Kouzana, 2000]. Une éruption maculopapulaire ou roséolaire est visible dans environ 50% des cas, partant du tronc vers les extrémités et la tête. Une lymphadénopathie, une anorexie, des nausées, des douleurs abdominales, de la diarrhée, une orchite et des signes respiratoires ont aussi été décrits, ainsi que des signes d'hépatosplénomégalie, d'hépatite, de pancréatite, de myocardite et des fièvres hémorragiques. Dans moins de 15% des cas cliniques, une méningite aseptique aiguë ou

une encéphalite se développent, associées à de la raideur, des vomissements, une confusion mentale, des anomalies de vigilance, une somnolence, des tremblements des extrémités, des réflexes anormaux, des convulsions, parésies, voire un coma. La paralysie peut s'observer soit lors d'encéphalite ou de méningite, avec des signes qui évoluent rapidement vers une faiblesse sévère, une paralysie de 1 à 4 membres, généralement sans perte sensorielle [Kouzana, 2000]. Les atteintes neurologiques sont le résultat du neutropisme du VWN qui s'exprime en général par une méningo-encéphalite [Le Guenno et al., 1996, Pruzanski et Altman, 1962].

Les manifestations cliniques dues à l'infection par le VWN ont été généralement, associées aux conditions épidémiologiques. En effet lors des premières épidémies en Israël et d'Égypte, l'aspect le plus fréquent a été un syndrome fébrile et algique avec parfois polyadénopathies et éruptions cutanées guérissant en quelque jours et sans séquelles. Ce syndrome pseudo-grippal atteint surtout les enfants et les adolescents dans les zones de forte endémicité [Chastel et al., 1977, Hayes, 2001].

L'évolution de la FWN humaine va d'une guérison spontanée totale jusqu'à des séquelles neurologiques parfois dramatiques, voire l'installation d'un coma neurologique dont l'issue est habituellement fatale. En cas de guérison l'homme développe une immunité spécifique et durable [Pruzanski et Altman, 1962]. Les symptômes régressent habituellement en 2 à 3 semaines, une évolution prolongée dans le temps peut être signalée chez les sujets âgés. Le Guenno (1996) [Le Guenno et al., 1996] a rapporté des séquelles après deux mois d'évolution chez 7 des 15 patients confirmés en Algérie.

En date d'Aout 2012, 1 590 cas humains de la maladie à virus West Nile ont été signalés aux États-Unis d'Amérique. Parmi ceux-ci, 889 (56%) ont été classés comme maladie neuro-invasive. Durant l'année 2012, des cas humains ont été observés (Tableau 3) en Italie, Grèce, Roumanie, Hongrie, Kosovo, Palestine, Russie, Serbie, Croatie, République de macédoine (Figure 17).

Pays	Nombre de cas
Grèce	161
Hongrie	8
Italie	45
Croatie	5
République de Macédoine	4
Israël	46
Romania	14
Kosovo	4
Palestine (territoire occupé)	2
Russie	397
Serbie	64
Tunisie	22
Algeria	1

Tableau 3. Recensement des cas humains de fièvre West Nile en Europe et en Tunisie ($n = 775$) en 2012 (04/10/2012). Source : European Centre for Disease Prevention and Control

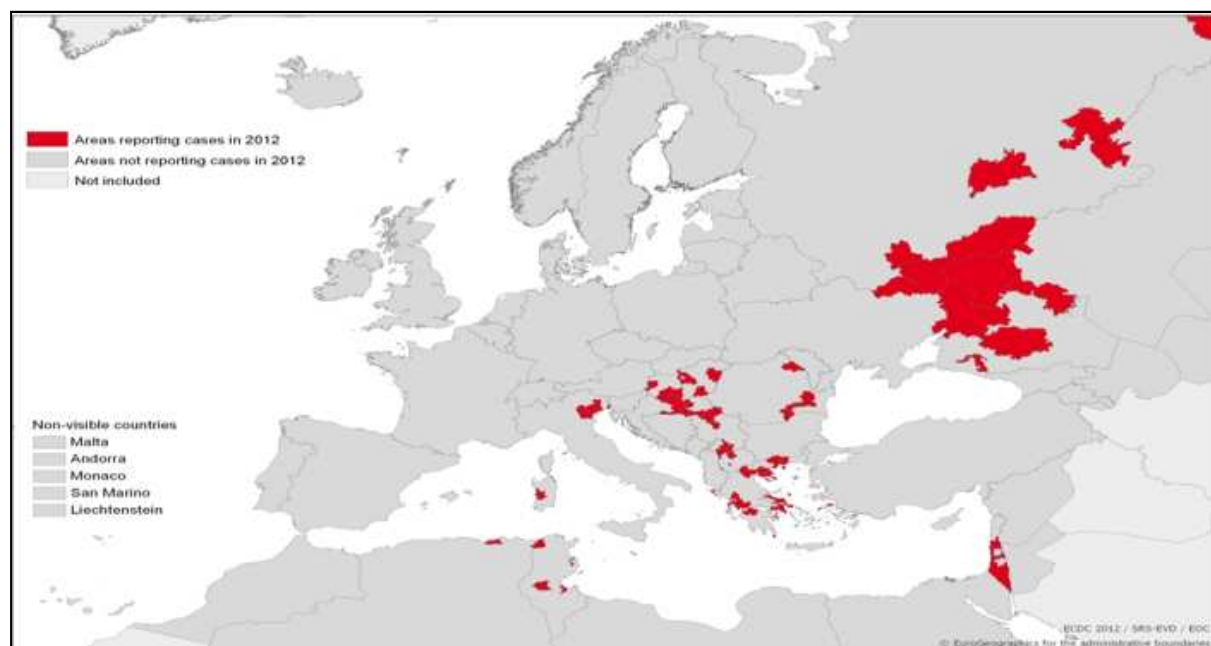


Figure 17. Distribution des cas d'infection par le virus West Nile en 2012 (25/10/2012) dans le bassin méditerranéen et en Europe. Source : European Centre for Disease Prevention and Control

Il n'existe pas à l'heure actuelle de traitement efficace contre la FWN. Toutefois, les traitements symptomatiques peuvent être utilisés.

La vaccination contre le VWN serait la meilleure protection pour les personnes à risque, (âgées ou habitant des zones à risque). Le vaccin idéal pour une utilisation chez l'homme serait celui qui pourrait être utilisé dans une épidémie imminente et qui permettrait de fournir une immunisation rapide, de préférence quelques jours après une dose unique. Actuellement Il n'existe aucun vaccin humain contre le VWN. Toutefois, il existe des essais cliniques sur des vaccins comme ChimeriVax-WN02 [Biedenbender et al., 2011] hautement immunogène chez les jeunes, adultes et les personnes âgées. Ce vaccin est encore dans les phases d'essai.

5.2 Les infections humaines par le virus West Nile en Tunisie

Selon les données de l'institut national des statistiques, la population tunisienne était estimée au 1 juillet 2011 à 10.673.800 habitants dont 60% sont installées dans les zones urbaines. La population rurale est relativement stable et constitue environ 40% de la population totale. La densité moyenne est de 50 habitants / km². En 2009, le taux d'accroissement naturel de la population était de 1,20% et l'indice synthétique de fécondité était de 2,05. L'espérance de vie à la naissance était de 74,5 ans.

La population urbaine est concentrée dans quelques grandes agglomérations littorales (5 parmi les 10 premières agglomérations du pays). Plus de la moitié de la population urbaine est répartie entre trois ensembles urbains littoraux : Tunis, Sousse, et Sfax (Figure 18). En 2010, près de 6.4 millions de tunisiens habitaient une agglomération dont 29% dans l'agglomération de Tunis, 19% dans les ensembles urbains régionaux de Sousse et Sfax, et 70% sur un littoral marin.

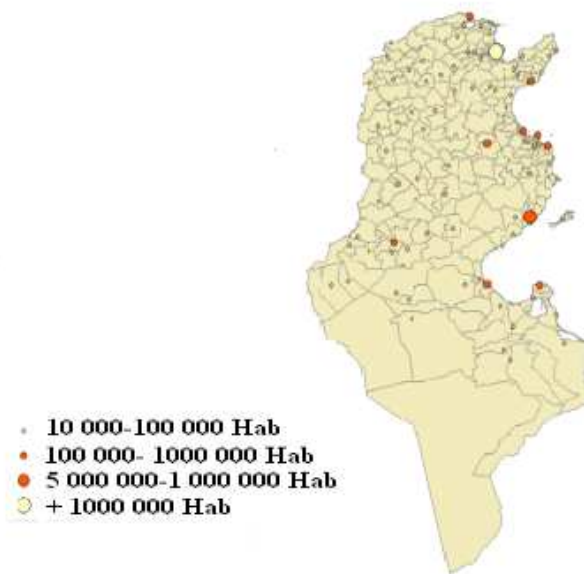


Figure 18. Population tunisienne par gouvernorat [Harre, 2011]

Selon Haddad [Haddad, 1980], la première enquête sérologique a été réalisée chez l'homme en Tunisie en 1968 par Hannoun (résultats non publiés) qui a testé 705 sérums humains pour la présence d'anticorps contre le VWN et d'autres arbovirus. Les résultats ont révélé une faible prévalence des anticorps contre le VWN dans diverses régions de la Tunisie (1,8%).

Dans les années 1970, Nabli et al. ont collecté 1.406 sérums (1.094 à Jerba, 205 à Tunis, 85 à Gabès et 22 dans d'autres régions) pour tenter d'expliquer la fréquence chez l'homme des syndromes méningo-encéphalitiques d'étiologie indéterminée. La prévalence sérologique des anticorps contre le VWN était de 3,8% dans l'île de Jerba, de 7,8% à Tunis, de 7,0% à Gabès, et de 9,0% pour les autres régions. La séroprévalence globale était de 4,7%. Les résultats de cette enquête reflètent l'existence de foyer d'activité limitée des virus étudiés et en particulier le VWN, le virus Sicile (Bunyaviridae, *Phlebovirus*) et le virus Sindbis (Togaviridae, *Alphavirus*). A l'époque, les auteurs avaient souligné la nécessité d'instaurer une surveillance sérologique des arboviroses en Tunisie, ainsi qu'une analyse des conditions biologiques des réservoirs et des vecteurs, et des essais d'isolement des virus. Cependant, aucune suite n'avait été donnée à ces recommandations.

L'automne 1997 a été marqué par l'occurrence d'une épidémie de méningo-encéphalite causée par le VWN dans deux gouvernorats côtiers de la Tunisie, avec au total 173 cas

dont 8 décès. C'est la première fois qu'une telle épidémie était rapportée en Tunisie. La grande majorité des cas provenaient des gouvernorats de Mahdia et Sfax : 105 cas (61%) et 53 cas (31%). Par rapport à la population totale des 2 gouvernorats, le taux d'attaque était 4,5 fois plus important à Mahdiab (Figure 19) qu'à Sfax : 30 et 7 cas pour 100 000 habitants (Figure 20). La grande majorité des malades vivaient en milieu rural : les grandes villes et chefs-lieux des gouvernorats sus-cités ont été épargnées. Une enquête menée auprès des malades n'a pas révélé de morbidité ou de mortalité anormale chez les oiseaux d'élevage et les équidés. Le nombre hebdomadaire de cas détectés était à son maximum durant les 3 dernières semaines d'octobre et la première semaine de novembre avec plus de 20 cas notifiés par semaine.

La souche virale isolée en Tunisie appartenait au lignage 1 et était proche de celle identifiée peu après à New York et en Israël que de celles trouvées au Maroc et en Italie

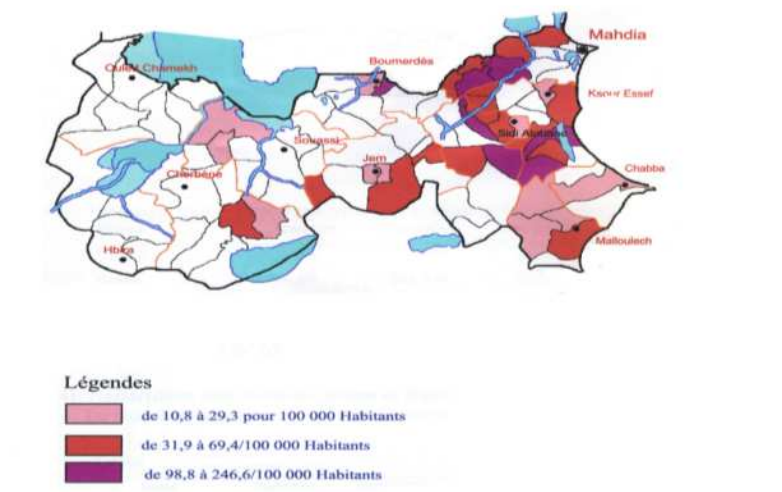


Figure 19. Taux d'attaque des cas de méningo-encéphalite humaine à virus West Nile pendant l'épidémie de 1997 dans le gouvernorat de Mahdia [Kouzana, 2000]

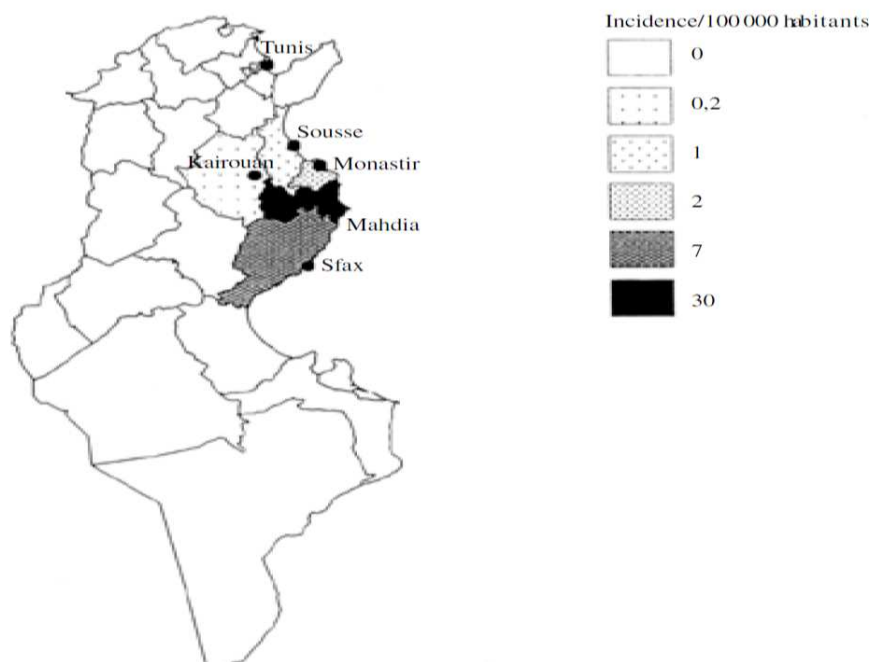


Figure 20. Taux d'incidence pour 100.000 habitants des cas de méningo-encéphalite à virus West Nile en Tunisie pendant l'épidémie de 1997 [Triki et al., 2001].

Une deuxième épidémie humaine a été signalée en 2003 dans la même zone que celle de 1997. Les gouvernorats touchés étaient Monastir, Mahdia, Sousse, Sfax et Gabès. L'épidémie a commencé fin juillet, les derniers cas ont été enregistrés au cours de la première semaine d'octobre. Sur 94 cas suspects, 31 ont été confirmés. Le virus n'a pas été isolé au laboratoire ni caractérisé par des analyses moléculaires.

En 2007, une enquête sérologique a été réalisée chez 1.854 sujets sains originaires de trois gouvernorats : Kairouan, Bizerte et Sfax. Les prélèvements ont été collectés durant la période allant de janvier à décembre 2007. Aucun cas d'infection à VWN n'avait été rapporté antérieurement à Bizerte, et uniquement deux cas sporadiques avaient été enregistrés à Kairouan. En revanche, Sfax avait été touché par les deux épidémies de 1997 et 2003. Une recherche des anticorps spécifiques de type IgG a été faite par ELISA indirect. La séroprévalence globale a été de 12,5 % avec répartition très variable selon les gouvernorats testés. Trois zones de transmission du VWN ont été trouvées ; forte prévalence sérologique à Kairouan (27,7%), séroprévalence moyenne à Sfax (7,5 %) et séroprévalence faible à Bizerte (0,7%). La séroprévalence était significativement plus élevée chez les sujets âgés de plus de 40 ans à Kairouan, caractérisé par la présence de plusieurs barrages.

En octobre 2010, la FWN a été diagnostiquée chez deux enfants de la région de Jendouba, au Nord de la Tunisie, à la frontière avec L'Algérie et à proximité du lac d'Alkala.

En octobre 2011, la FWN a été diagnostiquée chez 3 femmes âgées de 61, 70 et 77 ans dans le gouvernorat de Kébili, au Sud de la Tunisie, dans la région des oasis située à proximité du chott Eljerid.

En conclusion, la FWN semble être une maladie humaine émergente en Tunisie. Les conditions environnementales jouent probablement un rôle important à cet égard. En effet, au cours des mois de septembre 1997 et 2003, périodes des épidémies observées, la pluviométrie a été nettement plus importante dans le gouvernorat du Sahel que celle des mêmes périodes des autres années, favorisant ainsi la pullulation des moustiques au moment des migrations d'oiseau au retour d'Europe. La prédominance de l'infection humaine en milieu rural du Sahel pourrait être liée à l'exposition plus importante de cette population aux piqûres de moustiques. La rencontre entre vecteurs compétents et abondant, avec des populations denses d'hôtes aviaires réceptifs au VWN serait probablement la cause de l'amplification du cycle épidémiologique et du déclenchement des foyers et épidémies.

Bien que les différents composants du cycle de transmission du VWN restent mal connus en Tunisie (virus, moustiques, oiseaux), le risque d'apparition de nouvelles épidémies peut être considéré comme croissant, avec des conditions environnementales favorables à l'introduction et à l'amplification du virus, et la forte croissance des populations humaines concentrées dans les régions à risque (côtes et proximité des barrages hydro-agricoles). Ainsi, la FWN pourrait constituer un problème de santé publique de plus en plus préoccupant en Tunisie.

5.3 Infection des équidés par le virus West Nile

En 1968, le VWN a été le premier arbovirus isolé au Maghreb, à partir d'un lot de *Culex* collectés dans l'extrême sud du Sahara algérien [Pilo-Moron et al., 1970]. En 1996, il a été de nouveau isolé chez le cheval au Maroc. Entre temps des enquêtes séro-épidémiologique réalisées chez les petits mammifères sauvages (*Mus musculus*, *M. spretus*, *Rattus rattus*, *Eliomys tunetae*, *Ctenodactylus gundi* et *Pipistrellus kunli*) ne

laissent aucun doute sur sa circulation en Algérie, au Maroc et en Tunisie [Chastel et al., 1977].

En France, de 1962 à 1965, 50 chevaux environ sont morts en Camargue de FWN, régulièrement décrite par les vétérinaires de cette région. Plus récemment, en Italie (Toscane), 14 cas ont été déclarés dont 2 mortels [Berthet et al., 1997b]. En 1996, 94 cas équins ont été déclarés au Maroc dont 42 décès [Le Guenno et al., 1996, Zientara, 2002]. En Tunisie, seuls des cas humains ont été recensés.

En août 2010, l'Office International des Épizooties (OIE) a émis un rapport de notification immédiate suite à la déclaration de 5 foyers de FWN, dans la région de Macédoine centrale au Nord de la Grèce (Thessalonique) : 6 chevaux sur 18 ont présenté des signes cliniques. Un autre bulletin d'alerte a concerné l'émergence de cas de FWN en Italie. Sur 59 chevaux présents dans 5 foyers, 13 ont présenté des signes cliniques et un a été euthanasié. Un troisième bulletin d'alerte était relatif à une émergence de FWN en Espagne : en Andalousie sur les 7 chevaux présents, 2 ont présenté des signes cliniques. Dans la même période seize foyers équins ont été identifiés au Maroc essentiellement dans la région de Benslimane. Sur 111 chevaux, 17 ont présenté des signes cliniques et 8 sont morts (Tableau 4).

Pays	Nombre de cas
Grèce	12 (3 morts)
Italie	14
Bulgarie	8
Portugal	1
Maroc	17 (8 morts)

Tableau 4. Recensement des cas équins de fièvre West Nile survenus en 2010 en Europe et en Afrique du Nord

Chez le cheval, l'infection par le VWN est souvent inapparente. Cependant, lorsque les symptômes apparaissent, la maladie se manifeste de manière très variable, allant d'un simple syndrome grippal à une encéphalomyélite à fort taux de mortalité.

Les chevaux affectés montrent fréquemment une ataxie légère à sévère. Les signes cliniques peuvent aller d'une incoordination légère au décubitus. Quelques chevaux présentent également un affaiblissement, des tremblements musculaires, et des déficits des nerfs crâniens. La fièvre n'est pas un facteur de la maladie uniformément présent chez les chevaux. Les manifestations cliniques suite à des infections à VWN chez le cheval semblent comparable dans les différents pays européens quelle que soit la souche virale à l'origine de l'épizootie. Les signes d'ataxie et de paralysie ou parésie sont les plus fréquemment observés, tandis qu'une hyperthermie n'est relevée que dans moins de la moitié des cas.

Il n'existe pas de traitement spécifique de la FWN chez les équidés. Il faut isoler les chevaux atteints dans un local calme, semi-éclairé, désinsectisé et administrer un traitement symptomatique reposant sur une fluidothérapie associée à des anti-inflammatoires non stéroïdiens.

Chez les équidés, la lutte contre la FWN repose essentiellement sur des mesures de protection sanitaire, dont la lutte contre les moustiques vecteurs (désinsectisation, répulsifs) en zone infectée. Les insecticides sont un moyen simple et efficace pour réduire les populations de moustiques. La lutte anti vectorielle vis à vis des larves et des adultes peut être utilisée, cependant elle présente un coût écologique, qui n'est pas forcément signe d'efficacité [Artois, 2009]. Afin de contrôler l'origine principale des moustiques, il faut se concentrer sur la destruction des zones de reproduction (gîtes larvaires) et réduire ainsi le nombre de larves par épandage d'insecticides. On peut utiliser des répulsifs que l'on applique sur les chevaux. [Genain et al., 2010].

La vaccination est possible et assure une bonne protection contre la maladie sur la majorité des chevaux. Aux Etats-Unis, l'impact négatif du VWN sur la vie des équidés a renforcé l'intérêt commercial du développement d'un vaccin chez le cheval. Divers vaccins candidats ont été développés depuis 2000. Les études mises en place après la commercialisation du premier vaccin en 2003 ont souligné l'efficacité de la vaccination chez le cheval [Dauphin et Zientara, 2007b]. La vaccination entraîne la formation d'IgG, mais pas d'IgM, ce qui permet de différencier les animaux vaccinés (IgG sans IgM) de ceux qui ont été infectés assez récemment (IgG+IgM). La vaccination protège à la fois de la virémie, mais aussi des signes cliniques et de la mort [Vandaële, 2009].

5.4 Données générales sur les équidés en Tunisie

Aucun recensement précis n'a été fait jusqu'à présent concernant les équidés en Tunisie. Selon le Ministère de l'Agriculture, la population équine en Tunisie en 2005 comptait environ 188.000 équidés dont 40.000 mulets, 123.000 ânes et 25.000 chevaux.

Les chevaux sont généralement bien entretenus vivent dans de bonnes conditions d'hygiène et font l'objet d'un suivi médical permanent. Le cheval Pur-sang Arabe est surtout rencontré au nord du pays où l'on trouve des haras, des clubs hippiques et les champs de courses. Le Grand Tunis, du fait de la proximité du haras de Sidi-Thabet et des champs de course de Ksar Said, représente la zone de plus forte concentration du cheval Pur-sang Arabe. Il existe 5 haras d'états et une vingtaine de haras privés.

Les ânes et mulets sont utilisés pour effectuer la traction et les travaux agricoles en milieu rural. Ils appartiennent à des petits élevages familiaux dans lesquels les conditions d'hygiène et sanitaires sont souvent précaires.

Cette population équine est inégalement répartie sur le territoire tunisien : 36% de l'effectif total se trouve dans le nord (gouvernorats de Siliana, Jendouba et Bizerte) 46% se trouvent dans le centre (gouvernorats de Monastir, Mahdia, Sfax et Kairouan). Le sud ne représente que 18% de l'effectif total avec 63% d'ânes. Ainsi, plus de 80% des équidés sont répartis dans le Nord et le Centre où se trouvent également 80% des zones humides. Cela représente un facteur d'exposition des équidés au VWN.

5.5 L'infection à virus West Nile chez les mammifères en Tunisie

Chastel [Chastel et al., 1977] a effectué des travaux de terrain destinés à apprécier le rôle des petits mammifères dans l'épidémiologie des arboviroses en Tunisie. L'étude, réalisée en 1976-77 a concerné 156 sérums de rongeur. L'arbovirus le plus fréquemment rencontré a été le VWN (19.8%) on utilisant le test d'inhibition de l'hémagglutination Les espèces qui paraissaient plus spécialement impliquées dans la circulation du WNV ont été dans le Nord des muridés (*Mus* spp.), le rat (*Rattus rattus*) et des lérots (*Eliomys tunetae*), et dans le Sud des gondis (*Ctenodactylus gundi*) et une chauve-souris (*Pipistrellus kuhli*), avec 4 spécimens positifs à Beni Kheddache.

Une nouvelle enquête sérologique, chez les petits mammifères sauvages de Tunisie a été réalisée par Chastel en 1980 [Chastel et al., 1983] on utilisant le même test que l'enquête

précédente. La plupart des prélèvements provenaient de régions différentes des celles de l'enquête de 1976-1977. Aucune réaction positive contre le WNV n'a été décelée chez les 103 petits mammifères concernés par cette enquête : rongeurs, microchiroptères et insectivores.

Une étude réalisée en 1980 par Haddad a concerné les équidés (ainsi que le sanglier et l'homme). Au total, 556 équidés (205 ânes, 296 chevaux et 55 mulets) ont fait l'objet de prélèvements de sang. Aucun signe clinique chez l'animal n'a été rapporté aux enquêteurs. Les sérums des équidés ont tous été testés par inhibition de l'hémagglutination et seulement deux animaux âgés de 7 et 9 ans ont été positifs contre le VWN [Haddad, 1980].

Une étude séro-épidémiologique a été réalisée sur 269 sérums d'équidés récoltés en 2005 dans six régions de la Tunisie [Bergaoui et al., 2007]. Deux cent soixante neuf prélèvements, provenant de 6 gouvernorats côtiers (Gabes, Sfax, Mahdia, Monastir, Nabeul et Bizerte) ont été testés avec un test ELISA de compétition validé par les laboratoires de référence pour recherche des IgG. Le taux de séropositivité global était de 32%. La séroprévalence est beaucoup plus importante dans les gouvernorats côtiers du centre, notamment à Monastir. Les taux observés au nord, à Nabeul et Bizerte sont beaucoup plus faibles (9%). Sur les sérums étudiés par Bargaoui (2007) [Bergaoui et al., 2007], les mulets et les ânes (37%) ont montré une séroprévalence supérieure à celle des chevaux (25%).

L'étude séro-épidémiologique menée par Boubaker [Boubaker, 2008], dans les régions de Monastir et de Sfax, a porté sur 127 équidés. Le choix de la zone a été dicté non seulement par le fait qu'elle a été touchée par les deux épidémies de 1997 et de 2003, mais aussi pour ses caractéristiques climatiques et géographiques propices à la transmission du VWN. L'analyse sérologique a utilisé des test de séro-neutralisation. Elle a porté sur le dosage des IgG et des IgM. Trente-neuf prélèvements ont présenté un résultat positif en IgG (séroprévalence de 30%) et un seul résultat positif en IgM a été constaté soit une séroprévalence de 0,78 %.

Une étude a été menée sur 134 chevaux par le Centre national de veille zoosanitaire, entre juillet et octobre 2008, dans 3 gouvernorats du nord du pays (le Kef, Jendouba, et Bizerte). Cette étude a révélé une séroprévalence de 23% dans cette zone d'étude. Tous

les prélèvements provenant de Bizerte et du Kef se sont révélés négatifs [Nicolescu et al., 2009].

En conclusion de cette section, l'infection par le VWN chez les mammifères de Tunisie, notamment les équidés, semble être émergente en Tunisie car elle était rare ou absente il y a une trentaine d'années, alors qu'elle est aujourd'hui largement répandue. Cependant, les enquêtes chez les équidés sont restées limitées géographiquement et n'ont pas permis d'avoir une vision globale du passage ou de la circulation virale à l'échelle de la Tunisie. Un autre fait marquant est l'absence apparente de cas clinique chez les équidés. Ce silence est-il dû à un problème de sous-déclaration ou d'absence de diagnostic de laboratoire ? Des questions se posent aussi sur la fiabilité de système de surveillance des encéphalites chez les équidés, fonctionnel pour la rage mais sous-utilisé pour explorer les infections à *Flavivirus*.

Chapitre 2. Mapping the serological prevalence rate of West Nile fever in equids, Tunisia

Ce chapitre a été soumis pour publication dans la revue *Transboundary and Emerging Diseases*, en septembre 2012.

Transboundary and Emerging Diseases - submission proof



Mapping the serological prevalence rate of West Nile fever in equids, Tunisia

Journal:	<i>Transboundary and Emerging Diseases</i>
Manuscript ID:	Draft
Manuscript Type:	Original Article
Date Submitted by the Author:	n/a
Complete List of Authors:	Bargaoui, Ramzi; Institut de la Recherche Vétérinaire de Tunisie (IRVT), Service de virologie Lecollinet, Sylvie; Agence Nationale de Sécurité Sanitaire de l'Alimentation, de l'Environnement et du Travail (ANSES), Unité mixte de recherche n°1161 ANSES-INRA-ENVA "Virologie" Lancelot, Renaud; CIRAD, Mixed research unit CIRAD-INRA "Control of emerging and exotic animal diseases"
Subject Area:	Veterinary epidemiology, Zoonosis/Zoonotics, Emerging diseases

Abstract

West Nile fever (WNF) is a viral disease of wild birds transmitted by mosquitoes. Humans and equids can also be affected and suffer from meningo-encephalitis. In Tunisia, two outbreaks of WNF occurred in humans in 1997 and 2003; sporadic cases were reported on several occasions. Small-scale serological surveys revealed the presence of antibodies against WN virus in equid sera. However, clinical cases were never reported in equids, though their population is abundant in Tunisia. This study was achieved to characterize the nationwide serological status of WNF in Tunisian equids. In total, 1,189 sera were collected in 2009 during a cross-sectional survey. Sera were tested for IgG antibodies, using ELISA and microneutralization tests. The estimated overall seroprevalence rate was 28%, 95% confidence interval [22; 34]. The highest rates were observed (i) in the north-eastern governorates (Jendouba, 74%), (ii) on the eastern coast (Monastir, 64%), and (iii) in the lowlands of Chott El Jerid and Chott el Gharsa (Kebili, 58%; Tozeur, 52%). Environmental risk factors were assessed, including various indicators of wetlands, wild avifauna, night temperature, and chlorophyllous activity (normalized difference vegetation index: NDVI). Multimodel inference showed that lower distance to ornithological sites and wetlands, lower night-time temperature, and higher NDVI in late spring and late fall were associated with higher serological prevalence rate. The model-predicted nationwide map of WNF seroprevalence rate in Tunisian equids highlighted different areas with high seroprevalence probability. These findings are discussed, as well as perspectives to improve WNF prevention and disease surveillance in birds and equids, as well as epidemiological research.

Keywords

West Nile fever; equids; serological prevalence; environmental risk factors; risk map; Tunisia

Introduction

West Nile fever (WNF) is a mosquito-borne viral infection transmitted in natural cycles between birds and mosquitoes, particularly *Culex* species [Kramer et al., 2008]. Consequently, WN virus (WNV) transmission is sensitive to environmental conditions: it is strongly associated with the presence of wetlands and the occurrence of rainfall and flooding, as well as the abundance of avifauna and mosquitoes. Many bird species have been found infected by WNV and migrating birds are involved in its long-distance transmission.

In humans, WNV infection is usually an asymptomatic or mild febrile illness. However, meningo-encephalitis cases are observed with some fatalities in older or immunocompromised patients. WNV is also a cause of animal disease, especially in equids (horses, donkeys, and mules) in which possibly fatal meningo-encephalitis cases are observed. Both humans and horses are dead-end hosts for WNV: viremia is low and does not allow the infection of mosquitoes feeding on these hosts.

Sporadic cases and outbreaks of WNF in humans and equids have been reported after WNV discovery in 1937 in the West Nile Province of Uganda. In the late 1990s, outbreaks were increasingly reported in Europe: Romania (1996), Russia (1999) and the Mediterranean basin (1994, 1997, 1998-2000), with hundreds of human cases [Murgue et al., 2001a]. The virus was also introduced in the USA in 1999 where it caused a major epidemic and epizootic in birds, horses and humans, and progressively spread from Canada to Argentina and Brazil [Randolph et Rogers, 2010].

Recently, human outbreaks were reported from Central Europe and the Mediterranean basin: Albania, Hungary, Israel, Italy, Macedonia, the Palestinian Territory, Romania, the Russian Federation, Serbia, Spain, Ukraine, Tunisia, Turkey, Greece (2010-2012) [Calistri et al., 2010, García-Bocanegra et al., 2012, Papa et al., 2010, Sirbu et al., 2011].

In Tunisia, two major outbreaks of WNF were reported in humans. At the fall of 1997, a total of 173 human cases of meningo-encephalitis were recorded, with 8 deaths [Feki et al., 2005, Triki et al., 2001]. In 2003, WNV infections were confirmed in 21 patients with neurological signs, including 3 fatal cases [Hachfi et al., 2010]. No case was reported in equids in 1997 and 2003. The WNV identified in 1997 in Tunisia belonged to the Israeli-American cluster of WNV. It clearly diverged from the Western Mediterranean strains [Sotelo et al., 2011].

Tunisia shows a great diversity of eco-climatic patterns dominated by aridity. From 1999 to 2007 [Direction générale des ressources en eau, 2007], the northern region showed the highest rainfall with 577 mm year⁻¹, ranging from 324 to 843 mm year⁻¹; the central region was drier: annual rainfall of 280 mm year⁻¹ (153-375); (iii) the southern region had a Saharan climate with very low rainfall: 106 mm year⁻¹ (44-179). Wetlands are distributed throughout the country with a greater abundance in the north-western and central regions, including marshes, bogs, lagoons, salt flats (*sebkhas*), and flood-inundation playas (*Chott*) [Bryant et Rainey, 2002]. Among these wetlands, 20 sites were identified in the frame of the Ramsar International Convention on Wetlands of International Importance, covering > 700,000 hectares. These areas are hot spots of biodiversity and abundance of insects and avifauna, and the resting place of many migratory and resident birds, especially waterfowls [Hamdi et Chard Cheikhrouha, 2011]. Indeed, Tunisia is on the flyway of wild birds migrating between Africa and Europe. The winter counts of waterfowls recently conducted in Tunisian wetlands revealed the presence of 106 species, and an annual average of about 430,000 birds [Hamdi et Chard Cheikhrouha, 2011].

An entomological survey conducted in Tunisia after the WNF epidemic of 1997 [Feki et al., 2005] showed the abundance of *Culex* and *Aedes* species, potential vectors of WNV in Tunisia [El Ghoul, 2009]. *Culex pipiens* was abundant including in urban areas [Feki et al., 2005]: it is an opportunistic mosquito, feeding on birds and mammals. Therefore, it might play the role of bridge species between birds and mammals.

The equid population in Tunisia reaches ca. 188,000 (123,000 donkeys, 40,000 mules, and 25,000 horses), unevenly distributed in Tunisia: 36% in the North, 46% in the Centre, and 17% in the South.

No animal survey was carried out during the human outbreaks of 1997 and 2003. Three small-scale cross-sectional surveys were implemented in 2005, 2007 and 2008, two of which involved the outbreak areas of 1997 and 2003 [El Ghoul, 2009]. They showed WNV had circulated in the coastal and continental areas of the country. Thus, the national veterinary services (DGSV) decided to achieve a national cross-sectional serological survey in equids to assess the geographical extent of WNV infection, and provide information to implement better surveillance and control measures. We report here the results of this survey, attempting to find environmental factors associated with

the serological prevalence rate of WNV antibodies in equids, and to draw a national map of this epidemiological indicator. We propose some suggestions to improve WNF surveillance in equids, and discuss their relevance for WNF surveillance in humans.

1 Materials and Methods

1.1 Survey design

In Tunisia, imadas are the smallest administrative units ($n = 2,073$). In the absence of an exhaustive database listing the national population of equids, a two-stage sampling frame was adopted, with imadas as the first-stage units. DGSV established a list of 700 imadas where equid population was noticeable. A sampling fraction of 10% of these imadas was adopted, and a sampling size of 20 equids was chosen within these imadas, to achieve a 95% probability to detect at least one positive animal if the serological prevalence rate of WNV antibodies was at least 15%. Such a high prevalence rate was expected assuming that (i) WNV was regularly transmitted in the equid population, (ii) most sampled animals would be adults (according to previous surveys), thus with a possibly long WNV exposition history.

A list of 75 imadas was randomly drawn and the list of equid owners was established for each of them by the field veterinary officers. Then, a random sample of owners was drawn. At the most, two animals belonging to the same owner were bled: 10-mL blood samples were taken from the jugular vein in a dry tube. Samples were sent to the Institute of Veterinary Research of Tunis (IRVT) within 48 hours. Sera were extracted and stored at -20°C until serological analyses.

A retrospective survey on equid mobility was implemented to assess whether the serological prevalence rate observed in a given imada was an indicator of local WNV transmission. A 2-stage sampling frame was adopted. The equid sample size (secondary units) was set to reach a 5% precision under the assumption of a 10% frequency of equid entries or exits in the owner's flock: 138 equids, inflated to 200 to account for possibly large design effect [Bennett et al., 1991]. A target size of 10 equids by imada was set, resulting in an imada sample size of 20, increased to 22 to account for field constraints. Imadas were randomly selected among those involved in the serological survey, split by geographical region. The number of imadas in each region was proportional to the importance of the region in the serological survey: 10 (North), 10

(Centre), and 2 (South). Each selected owner was visited and interviewed according to the 12Mo method [Lesnoff, 2008]. Firstly, present equids were listed and their origin (place, date and occasion of entry) was recorded. Secondly, the owner was asked to enumerate equid entries and exits (date, occasion) that occurred during the 12 previous months. The survey was done by field veterinary officers supervised by the first author.

1.2 Laboratory procedures

Sera were tested with a commercial ELISA detecting WNV antibodies recognizing structural pre-membrane (prM) and envelop (E) proteins (IDScreen WN competition ELISA kit, IDVET Innovative Diagnostics). Samples were added to the wells coated with recombinant prM and E proteins. The anti-prM/E antibodies, if present, formed an antigen-antibody complex. An anti-prM/E antibody peroxidase (po) conjugate was then added to the wells, possibly forming an antigen-conjugate-po complex. After addition of a substrate solution, micro-plates were read with a spectrophotometer at 450 nm wavelength. Results were validated if the mean value of the optical density (OD) of the negative control (NCOD) was > 0.7 , and the mean value of the positive control OD (PCOD) was $< 30\%$ of the NCOD. Then, we computed the S/N percentage (S/N%): $100 * \text{sample OD} / \text{NCOD}$. Samples showing an $S/N\% \leq 40\%$ were considered as positive. Those with $40\% < S/N\% \leq 50\%$ were considered as doubtful. Samples with $S/N\% > 50\%$ were considered as negative.

A microneutralization test (MNT) was used to confirm the results of ELISA. Heat-inactivated sera, serially diluted (1/5 to 1/3645) in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) were mixed with an equal volume (50 μL) of DMEM containing 100 TCID₅₀ of WNV, Is98 strain (kindly provided by P. Desprès, Institut Pasteur). Cell and virus (100 TCID₅₀ of WNV) controls were added onto each plate. Moreover, 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , and 10^{-4} dilutions of the virus suspension were prepared for its back titration. After incubating the plates at 37°C for 1.5 h, 2×10^4 Vero cells in 100 μL of DMEM were added to every well. Plates were incubated at 37°C for 3 days and read under microscope, looking for cytopathogenic effects. Results were validated if (i) infected cells were absent in the cell controls, (ii) infected cells were present in the virus controls, (iii) virus titre was comprised between 75 and 125 TCID₅₀ per well, (iv) no protective effect was seen with the negative reference serum, e.g., every well with the negative reference sera was infected, and (v) the positive reference serum protected Vero cells from infection, and

the average neutralizing antibody titre for this positive reference serum was 90. A serum was considered as negative if cells were found infected at any serum concentration. It was considered as positive if cells were protected with the first serum dilution; its titre was calculated as the inverse of the latest dilution at which cells were protected.

1.3 Data set

For the i^{th} imada ($i = \{1, \dots, I\}$, with I the number of imadas in the first-stage sample), the response was the observed serological prevalence rate of antibodies against WNV, i.e., the proportion π_i of y_i positive tests over the number n_i of tested sera: $\pi_i = y_i / n_i$.

We selected the environmental variables used to model π_i according to knowledge on WNV epidemiology [Eisen et Eisen, 2011]. Surface water is necessary to the larval development of mosquitoes, as well as for the presence and abundance of many wild bird species – either settled or migratory. Therefore, we selected a vector layer (186 polygons) of inland water bodies, freely available in the DIVA-GIS repository <http://www.diva-gis.org/>.

In the frame of Ramsar International Convention on Wetlands of International Importance, 20 wetlands of national importance were identified in Tunisia: major resting, feeding, and breeding sites for wild birds. We have georeferenced these wetlands. For each serological prevalence data point, we have computed the shortest distances (i) to inland water bodies, and (ii) to the Ramsar sites, and used them as two explanatory variables.

We used a topographic wetness index (TWI) dataset provided by the Earth Resources Observation and Science Center (USA, <http://eros.usgs.gov/>) at a 1-km pixel resolution. This index combines local upslope contributing area and slope. It is related to soil moisture and vegetation which are important for the larval development and adult resting sites of many insect species. It is used to quantify topographic control on hydrological processes, and proved useful in ecological studies [Sørensen et al., 2006].

Temperature, relative humidity, and vegetation are key variables for the development of mosquitoes. We selected two remotely-sensed MODIS data sets provided by the National Aeronautics and Space Administration (<http://modis.gsfc.nasa.gov/>):

- night-time land surface temperature (NLST), because many mosquito species are mostly active from sunset to dawn, and temperature is a major factor for their activity, as well as for the dynamics of the extrinsic virus cycle in WNV-infected mosquitoes,
- normalized difference vegetation index (NDVI) is related to chlorophyllous activity. Vegetation is important for adult mosquito resting sites, and is a proxy for relative humidity which is a factor for mosquito survival.

These MODIS data have a moderate spatial resolution (pixel size of 1 km) and a high temporal resolution: each pixel on the Earth surface is sensed twice a day. Because serological data represented a cumulative exposition to WNV possibly spanning over several years (depending on equids' age), we needed environmental variables representative of a long time period. We selected NLST and NDVI data recorded from 2001 to 2008, and processed by temporal Fourier analysis (TFA) which transforms a series of observations taken at intervals over a period of time into an arithmetic mean, and a set of (uncorrelated) sine curves, or harmonics, of different frequencies, amplitudes, and phases that collectively sum to the original time series. The most important harmonics are often those for the annual, bi-annual, and tri-annual cycles of seasonal changes, because they often have a clear biological interpretation [Scharlemann et al., 2008]. Therefore, 7 variables were used for each of NLST and NDVI: the arithmetic mean, the annual, bi-annual, and tri-annual amplitudes, and the annual, bi-annual, and tri-annual phases. These TFA dataset were built by Prof Rogers' team, Oxford University, at a 1-km spatial resolution.

For each raster dataset (TWI and the TFA-processed NLST and NDVI variables), we computed the mean value within a 5-km radius buffer around each serological prevalence data point. These values were used as the explanatory variables in the modelling steps.

1.4 Statistical analysis

Given the adopted sampling frame for the serological survey, a clustering (within-imada) effect was expected, resulting in wider confidence intervals for epidemiological estimates than expected for independent observations [Bennett et al., 1991]. We

estimated the intra-cluster coefficient ρ using a mixed-effect model [Goldstein et al., 2002] and the design effect $D = 1 + (b - 1) \rho$, with b the average sample size.

We modelled π_i with environmental variables at a national scale, (i) to find environmental patterns associated with WNV activity, and (ii) to estimate a WNV seroprevalence probability map for equids at the national scale. For a given imada i , π_i was modelled using binomial logistic regression. Because we had many explanatory variables, model selection was an issue. We used the framework of information-theoretic criteria, and multimodel inference [Burnham et Anderson, 2002]. This framework is based on the Akaike information criterion (AIC) which is defined as $AIC = -2 * \log(L) + 2 * k$, where L is the maximized likelihood, given the data and model parameters, and k is the number of fitted parameters in the model. The term $-2 * \log(L)$ is the deviance which decreased when more terms are added in the model. Because deviance is penalized by $2 * k$, AIC is a trade-off between minimum bias, and the number of parameters in the model. For a set of logistic regression models fitted on the same dataset, the best model has the smallest AIC. Because the number of sampled imadas (I) was small compared with the number of k model coefficients ($I / k < 40$), a small-sample correction was needed:

$$AICc = AIC + 2 * k * (k + 1) / (n - k - 1).$$

Moreover, the actual distribution of the response often has a variance greater than expected under the binomial assumption. If this is not accounted for, this can lead to the selection of a spurious number of variables. Lebreton et al. (1992) proposed to use the overdispersion parameter \hat{c} (model deviance divided by the number of residual degrees of freedom) to compute $QAIC = AIC / \hat{c}$, and its small-sample version

$$QAICc = QAIC + 2 * k * (k + 1) / (n - k - 1).$$

We fitted a set of R models (see below) which were ranked according to increasing $QAICc$. The difference Δ_j was computed for model j : $\Delta_j = QAIC_j - QAIC_{\min}$, with $QAIC_{\min}$ the smallest $QAICc$ observed among the R models. The relative likelihood of model j given the data was computed: $L_j = \exp(-0.5 * \Delta_j)$, as well as the probability of model j given the set of R models, and available data: $w_j = L_j / \sum_{r=1}^R L_r$. These probabilities were used (i) to build a “confidence interval” of S plausible models, with $S < R$ (e.g., the set of S models achieving a cumulated probability of 90%), (ii) to compute weighted coefficients

and predictions from the set of S models, and (iii) to compute weighted variance for model coefficients and predictions. The explanatory variables were ranked according to their frequency in the R models, thus providing an index of their importance.

Exploratory data analysis was used to reduce the number of explanatory variables, and define the set of R models. We checked their correlations with bivariate scatter plots and correlation matrix. When high correlation ($r > 0.8$) or strong non-linear relationship was noticed between 2 variables, we only kept the one with the most straightforward bio-ecological meaning. To assess the relationship between dependent and independent variables, we computed univariate, generalized additive models of serological prevalence rate against smoothing splines of each explanatory variable [Hastie et Tibshirani, 1990]. After visual inspection (shape and span on the logit scale), explanatory variables unrelated with the dependent variables were discarded ($p < .25$); variables showing non-linear relationship with the dependent variable were categorized. The reduced set of variables, and their two-way interactions, was used to build the set of R models. The model selection procedure described above was applied to build a 90% confidence interval of S models which were subsequently used for multi-model inference and prediction. For this purpose, the Tunisian territory was divided into 5-km pixels in which each explanatory variable was averaged. Serological prevalence was predicted for this new dataset, using the S models.

For model validation, the receiver operating characteristic (ROC) curve was plotted (sensitivity = $f(1 - \text{specificity})$) and the area under the curve (AUC) was calculated. To assess the predicted power of the fitted model of seroprevalence rates, the data set was randomly split into a training data set (75% of observations), and a validation data set (25% of observations). The positivity threshold defined for the training data set was used to compute the sensitivity and specificity on the validation data set.

The R software [R Core Team, 2012] was used for data analysis. Additional R packages “raster”, “rgeos”, “rgdal”, and “sp” were used for spatial data and plotting [Bivand et al., 2008], and “MuMIn” for model averaging and multi-model inference [Barton, 2012].

2 Results

In total, 1,189 sera were sampled in 74 imadas, i.e. 807 donkeys, 273 horses, 107 mules, and 2 equids of unstated species. A subsample of 102 sera was tested using the MNT, showing a 100% concordance between ELISA and MNT.

The estimated overall serological prevalence rate was 28% ($n = 1,189$), with a 95% confidence interval [22; 34]. The intra-cluster correlation was $\hat{\rho} = 0.29$, and mean sample size at the imada level was 16, leading to an estimated design effect $\hat{D} = 5.4$.

The mobility survey involved 226 animals. Their median age was 6 years, ranging from 2 to 15: most animals were born after the 1997 WN fever epidemic, and only 18% of them were born when the 2003 epidemic occurred. Seven entries (3%) were reported by the farmers; no exit was mentioned during the previous 12 months. Therefore, observed serological results at the imada level were good markers of local WNV transmission.

There were neither between-species, nor between-gender significant differences in serological prevalence rates. Strong spatial heterogeneities were observed in prevalence rates (Figure 21). The highest serological prevalence rate was observed in the north-eastern governorates of Tunisia (Jendouba, 74%). High serological prevalence rates were also observed on the eastern coast (Monastir, 64%), as well as in lowlands of Chott El Jerid and Chott el Gharsa (Kebili, 58%; Tozeur, 52%), two ephemeral lakes belonging to a large zone of playas stretching from the lowlands of southern Tunisia to the Atlas Mountains of northern Algeria.

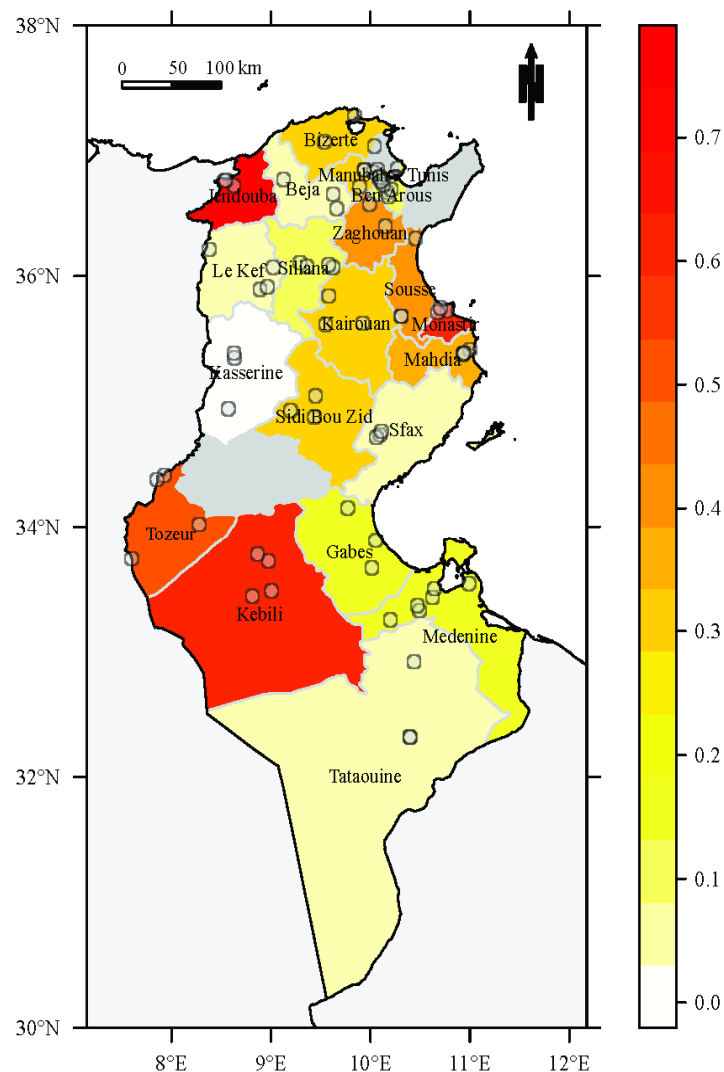


Figure 21. Observed serological prevalence rate of antibodies against West Nile virus in equids aggregated at the governorate level, Tunisia, 2009 (1,189 equids sampled in 74 imadas). Survey locations are shown as white points. The scale bar on the right is a color code for the serological prevalence rate. No data were available for governorates in grey.

After the step of exploratory data analysis, 5 explanatory variables were retained:

- NLSTa0: arithmetic mean of night-time land surface temperature,
- NLSTa1: annual amplitude of night-time land surface temperature,
- NDVIp2: bi-annual phase of normalized difference vegetation index,
- DRams: distance to the nearest Ramsar site,
- Dhz: distance to the nearest wetland.

Generalized additive models (not shown here) highlighted non-linear relationship between the seroprevalence rate and the explanatory variables NLSTa1, NDVIp2, and DRams. Each of them was split into 3 categories according to the 33.3% quantiles of their empirical distribution.

The 90% confidence set of models according to the cumulated probabilities w_j (Tableau 5) included 10 models with a combination of 6 explanatory variables (main effects and interactions). Their relative importance is displayed in Tableau 6, and multi-model averaged coefficients are presented in Tableau 7. The overdispersion parameter was high ($\hat{c} = 3.0$), confirming the need to use QAICc. The AUC computed from the 10 models was 0.76. The positivity threshold minimizing the distance between the ROC curve and the upper left corner of the ROC plot was 0.33, leading to a sensitivity of 0.65, and a specificity of 0.76. This model and set of averaged coefficients applied to the validation data set, with the same positivity threshold, provided a sensitivity of 0.76 and a specificity of 0.70.

The distance to the nearest Ramsar site, the arithmetic mean of NLST, and the bi-annual phase of NDVI had high and similar importance (0.97, 0.96, and 0.91). Coefficient interpretation of the two former variables was difficult given the existence of an interaction between them (fourth variable in importance: 0.79). Smaller distance to the Ramsar site, and lower mean NLST were associated with higher serological prevalence rate; however, the interaction coefficients were positive and strong, i.e., higher values of NLST combined with longer distance from the Ramsar sites were associated with higher serological prevalence rate.

Tableau 5. Ninety per cent confidence set of 10 binomial logistic regression models of West Nile serological prevalence rate in Tunisia (1,189 sera, 74 imadas), selected according to QAICc.

model	df	<i>logLik</i>	<i>QAICc</i>	Delta Weight	
1356	11	-125.8	114.3	0.00	0.61
12356	13	-120.3	117.7	3.38	0.11
135	7	-150.4	118.4	4.11	0.08
1236	11	-133.8	119.6	5.33	0.04
1235	9	-143.7	119.8	5.48	0.04
125	7	-153.5	120.4	6.11	0.03
123	7	-153.5	120.4	6.12	0.03
13456	13	-125.5	121.1	6.79	0.02
23	5	-162.8	121.2	6.91	0.02
25	5	-163.9	121.9	7.62	0.01

1 distance to the nearest Ramsar site (DRams); 2 distance to the nearest humid zone (Dhz); 3 arithmetic mean of night-time land surface temperature (NLST); 4 annual amplitude of NLST; 5 bi-annual phase of normalized difference vegetation index; 6 interaction between DRams and arithmetic mean of NLST.

Tableau 6. Relative importance of explanatory variables according to the 90% confidence set of 10 binomial logistic regression models of West Nile serological prevalence rate in Tunisia (1,189 sera, 74 imadas), selected according QAICc.

Explanatory variable (categorized)	Importance
Distance to the nearest Ramsar site (DRams)	0.97
Arithmetic mean of night-time land surface temperature (NLST)	0.96
Bi-annual phase of normalized difference vegetation index	0.91
Interaction between DRams and the arithmetic mean of NLST	0.79
Distance to the nearest humid zone (Dhz)	0.29
Annual amplitude of NLST	0.02

Tableau 7. Model coefficients and 95% confidence intervals (CI) averaged over a set of 10 binomial logistic regression models (table 2) of West Nile serological prevalence rate in Tunisia (1,189 sera, 74 imadas), selected according QAICc.

Coefficient	Estimate	Lower CI	Upper CI
Intercept	-0.76	-1.77	0.25
cdrams2	-1.83	-3.21	-0.44
cdrams3	-2.70	-4.35	-1.04
cLSTNa02	-0.37	-1.28	0.54
cLSTNa03	-0.51	-2.11	1.09
cNDVIp22	0.45	-0.09	0.99
cNDVIp23	1.47	0.82	2.12
cdrams2:cLSTNa02	1.44	0.31	2.57
cdrams3:cLSTNa02	2.37	1.06	3.67
cdrams2:cLSTNa03	3.04	1.80	4.29
cdrams3:cLSTNa03	3.30	2.11	4.49
cdzh2	-0.40	-0.90	0.09
cdzh3	-1.20	-1.95	-0.44
cLSTNa12	0.18	-0.30	0.66
cLSTNa13	0.07	-0.44	0.57

Each explanatory variable was split into 3 equal-size categories defined by 33.3% quantiles numbered 1, 2, and 3. DRams distance to the nearest Ramsar site; Dhz distance to the nearest humid zone; NLSTa0 arithmetic mean of night-time land surface temperature (NLST); NLSTa1 annual amplitude of NLST; NDVIp2 bi-annual phase of normalized difference vegetation index; DRams:NLSTa0 interaction between Drams and NLSTa0

Higher values of the bi-annual phase of NDVI were associated with higher values of the serological prevalence rate: humid late spring and fall were more favourable to WNV transmission than drier occurrences of these seasons.

The two other variables had minor importance: distance to the nearest humid zone (0.29) and annual amplitude of NLST (0.02). For the former, sign of the associated coefficients was as expected: the serological prevalence rate was higher for shorter distance to the humid zone. Regarding the latter, lower values of annual amplitude for NLST were associated with lower serological prevalence rate.

The nationwide risk map for WNV antibody serological prevalence rate in Tunisian equids (Figure 22) highlighted different areas with high serological prevalence probability from northern to southern Tunisia:

- Northern parts of Jendouba (74%), Beja (65%) and Bizerte (30%) governorates , and coastal regions of Sousse (40%) and Monastir (64%) governorates;
- The southern part of Sfax (5%) and Sidi Bou Zid (32%);
- A region intersecting the Siliana (13%) and Kairouan (30%) governorates ;
- A large part of Tozeur (52%), and the northern part of Kebili (58%), corresponding to the Chott area.

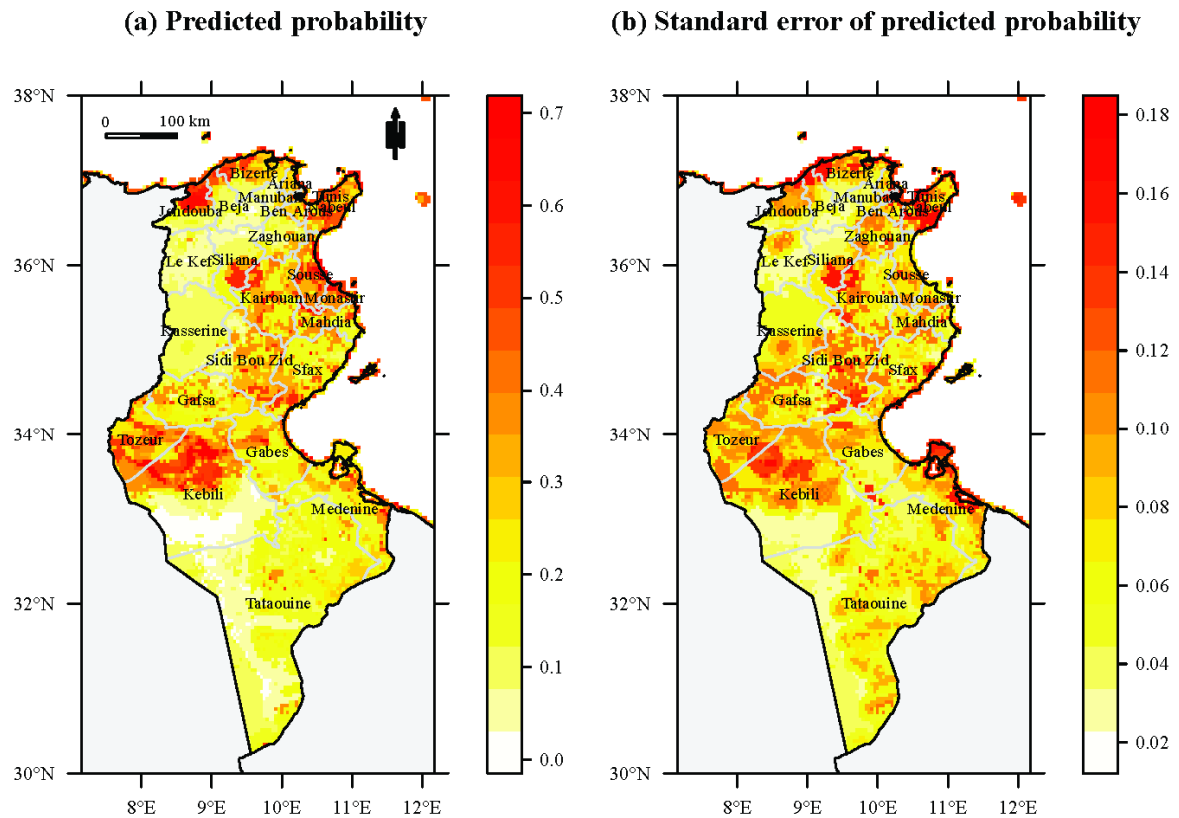


Figure 22. Prediction of West Nile serological prevalence rate in equids, 2009, Tunisia (a) predicted probability, (b) standard error of predicted probability. Estimates were obtained with a set of 10 binomial logistic regression models of West Nile serological prevalence rate in Tunisian equids, selected according to QAICc. The scale bar on the right of each plot is a color code for the serological prevalence rate (a) or its standard error (b).

2.1 Discussion

Diagnostic methods and serological prevalence rate

Serological surveys are widely used for the assessment or surveillance of WNV transmission. Easy identification of epidemiological units, straightforward design of sampling frames, and available serological methods make them popular. ELISA tests are commonly used to assess antibody prevalence but they suffer from a lack of specificity due to cross reactions between antibodies directed against WNV and other *Flaviviruses* like Usutu virus [Ledermann et al., 2011]. The perfect agreement (100%) observed between ELISA and MNT results was an indication that most serologically positive equids had been infected with WNV, indeed. However, we cannot exclude the possibility

that some other *Flavivirus* had also been transmitted to equids, with a low prevalence rate. Moreover, the low mobility and turnover observed in equid populations showed that positive animals had been infected close to the sampling sites. This was important to check before trying to identify environmental features associated with serological prevalence rate.

The observed design effect was high ($\hat{D} = 5.4$), meaning that sampling size computed under the assumption of independent observations should at least be doubled (square root of $5.4 \approx 2.3$) to achieve the same target precision [Bennett et al., 1991]. The intra-cluster correlation was also high ($\hat{\rho} = 0.29$), as compared with values commonly observed in veterinary epidemiology studies in developing countries [Otte et Gumm, 1997]. Because there is no between-equid WNV transmission, this high intra-cluster correlation suggested that environmental factors closely related to mosquito abundance and mosquito infection rate strongly differed between imadas. This information might be useful for future WNV serological surveys in Tunisia. Indeed, because the design effect linearly increases with within-cluster sampling size (for a fixed intra-cluster correlation coefficient), one should sample fewer animals in a greater number of imadas to achieve a better precision with the same overall sample size. Given the relatively small country size, and concentration of equids in the central and northern parts of Tunisia, this sampling design might not result in higher survey costs.

The observed WNV serological prevalence rate (28%, $n = 1,189$) was similar to previous observations made by Ben Hassine et al. [Ben Hassine et al., 2011] in the north-western part of Tunisia (27%, $n = 133$). Indeed, equid sera collected and tested as from 2005 have shown a strong WNV transmission in the central region of Tunisia, as well as in other parts of the country: Monastir (74%), Mahdia (46%), Sfax (44%), Bizerte, Jendouba, and Kef (30%) [Bergaoui et al., 2007].

In sub-Saharan Africa where WNV is considered as endemic, similar prevalence rates were observed in Côte d'Ivoire (28%, $n = 95$) or Democratic Republic of Congo (30%, $n = 20$) [Cabre et al., 2006]. They were even higher in Chad (97%, $n = 30$) or in Senegal (92%, $n = 25$). Other results obtained in this latter country confirmed high prevalence rates in Senegal Valley (85%, $n = 367$) and Fossil Ferlo Valley (78%, $n = 120$) [Chevalier et al., 2010, Chevalier et al., 2006]. Similar findings were also obtained in South Africa (75% in mares, $n = 243$) [Guthrie et al., 2003]. The seroprevalence rate observed in

Tunisia might be consistent with the assumption of endemic WNV activity. However, repeated introductions of WNV at the occasion of bird migrations, followed by local transmission and amplification of WNV in bird populations, might lead to similar serological patterns. In addition, these two processes (endemic transmission and repeated introduction) might occur together. Therefore, this serological survey should be completed with ecology and virology studies in birds, equids, and mosquitoes to decipher WNV transmission processes in Tunisia.

The observed serological prevalence rate was comparable in equids and humans over the same study period on the north-eastern coast of Tunisia: 5% in equids vs. 8% in humans in Sfax, 30% vs. 28% in Kairouan [Bahri et al., 2010]. However, different results were reported in the northern area of Bizerte, with a higher seroprevalence rate in equids (30%) than in humans (1%). This was probably related to a greater exposure risk in equids. Indeed, in the Bizerte governorate, equids were mostly sampled around Lake Ichkeul which is a breeding, resting, and stop-over site for many local and migratory bird species. Thus, we did not confirm the conclusions of Bahri et al. (2010) who considered the region of Bizerte as weakly endemic for WNV infection in humans. Of course, risk factors for WNV infection might be different in humans and equids. However, high seroprevalence rate in equids, sampled in the vicinity of human habitat, provided evidence that several human population clusters were strongly exposed to WNV in northern Tunisia.

Environmental risk factors for WNV serological prevalence rate

Geographic variations of WNV serological prevalence rate were predicted by the set of selected models (Figure 22). High predicted values occurred (i) in the northern parts of Jendouba, Beja, and Bizerte governorates, (ii) in the coastal regions of Sousse and Monastir governorates, (iii) in a region intersecting the Siliana and Kairouan governorates, and (iv) in the Chott area (Tozeur, Kebili). A low precision of estimates was observed in the coastal region of the Medenine governorate. Environmental conditions were not favourable for WNV serological prevalence rate, but the presence of wetlands and Ramsar sites (source of possibly infected birds and mosquitoes) might trigger transmission in case of exceptional climatic event e.g., high rainfall.

The distance to the closest Ramsar site was the most important explanatory variable, present in 97% of the investigated models of serological prevalence rate. A further

evidence of the importance of this risk factor was the occurrence in 2011 of 3 human cases of WNF in Kebili, in the Chott area, near one of the Ramsar sites [National Health Authorities of Tunisia, 2011]. Because wetlands provide suitable habitats for mosquitoes and birds, they are also favourable places for the emergence of WNV [Bengis et al., 2004, Kramer et al., 2008]. Ramsar sites are protected areas with a higher animal abundance and higher biodiversity than elsewhere. Migratory birds may introduce WNV in such ecosystems, either from Africa or Europe [Malkinson et al., 2002]. Afterwards, contrasted mechanisms may favour or disfavour virus transmission to equids. High bird biodiversity may be a protecting factor against WNV transmission, with the so-called dilution effect [Allan et al., 2009, Swaddle et al., 2008]: the net effects of biodiversity (including host and non-host species) might reduce the risk of certain diseases in ecological communities [Keesing et al., 2006]. Also, reduction of bird biodiversity may increase the risk of WNV transmission [Allan et al., 2009]. We may assume bird biodiversity, and consecutively WNV transmission risk, showed large seasonal and temporal variations related to bird migrations, the availability of surface water and food resources. Moreover, the different categories of humid zones – including Ramsar sites, harboured bird species with a wide range of biodiversity. Hamdi and Charfi-Cheikhrouha (2001) have observed that bird species richness and diversity was minimal in Chott, sebkhat, and dam wetlands. Besides the Chott area mentioned above, the governorate of Jendouba harbours several large dams. The highest WNV serological prevalence rates were observed in this governorate, reaching 70% in equids. In future WNF studies, a more thorough database of wetlands might be used, as well as indicators of bird species biodiversity [Amari et al., 2011].

The arithmetic mean of NLST and the bi-annual phase of NDVI were also important explanatory variables of WNV serological prevalence rate (relative importance of 0.96 and 0.91), with straightforward interpretation. The positive interaction between NLST and the distance to the nearest Ramsar site (relative importance of 0.79; see also Figure 21) was more difficult to understand. On the one hand, the proximity with a Ramsar site was a source of infected mosquitoes; however, surface water decreased NLST. Consecutively, mosquito activity might have been lower, with a longer extrinsic virus cycle, and finally a lower WNV transmission rate. On the other hand, mosquitoes were probably more active when temperature increased, i.e. farther from Ramsar sites.

However, their abundance rapidly decreased when the distance from the Ramsar site increased.

High NDVI values are related to higher photosynthetic activity and enhanced food supply for animals, as well as breeding and resting sites for mosquitoes. Hence, seasonal differences in NDVI are one of the best predictive factors for mosquito abundance [Brownstein et al., 2002, Jacob et al., 2009].

Proposals for WNV prevention and surveillance

In countries where WNV is endemic, local breeds of horses and donkeys rarely show clinical signs. However, “new” strains of WNV with higher virulence might be introduced and cause severe cases in equids. This happened for instance in Morocco in 2003 with a lineage-1 WNV [Schuffenecker et al., 2005], or in South Africa with a lineage-2 WNV: viruses from this latter lineage were previously considered as non-pathogenic [Venter et al., 2009]. Therefore, it is necessary to implement and maintain a comprehensive WNF surveillance system in Tunisia, including advanced laboratory diagnostic for virus isolation and fine characterisation, up to the molecular level. If a pathogenic virus is identified, commercial vaccines against WNV are available and can be used to vaccinate valuable animals [Beasley, 2011, Dauphin et Zientara, 2007b].

In Tunisia, WNF surveillance in equids mostly consists in passive surveillance, with clinical suspicions reported by equid owners to veterinary practitioners and veterinary officers. An improvement would be to implement syndromic surveillance of neurological cases in equids. Indeed, this is already partly done in the frame of rabies surveillance: samples are taken from horses dying with neurological signs and are tested for rabies virus in Tunis Institut Pasteur. To improve WNF surveillance sensitivity, specific trainings on the epidemiology, diagnosis and surveillance methods of this disease should be organized for field veterinarians and technicians. Moreover, systematic testing of horse brain samples should be implemented, together with laboratory participation in international ring trials.

Regarding the entomological aspects, the identification of mosquito species responsible for WNV transmission (i) from infected to sensitive birds (enzootic vectors), and (ii) to equids and humans (bridge-species vectors) is a pre-requisite before implementing entomological surveillance. Little is known in Tunisia on this topic. Moreover, studies on distribution and population dynamics of mosquito species would be useful for this

purpose. These preliminary researches must be undertaken to provide the basis of a risk-based entomological surveillance of WNF in Tunisia.

Wild bird mortality monitoring, associated with the testing for WN, Usutu and avian influenza viruses would presumably allow the identification of highly pathogenic virus strains before they infect humans. Mass mortality of crows was recorded during the 1997 outbreak [Feki et al., 2005]. This could not certainly be linked with WNV infection because no investigation was made in dead birds. However, WNV isolated from an infected patient in Tunisia at that time was similar to an Israeli strain isolated from a dead goose, as well as to the strain which was introduced in New York in 1999, and caused alarming die off in many bird species, particularly corvids [Lanciotti et al., 1999]. Besides mortality events, serological monitoring of peri-domestic bird species like the Eurasian magpie (*Pica pica*) is considered as a sensitive indicator of WNV transmission [Jourdain et al., 2008]. This bird species is present in northern Tunisia. Other Tunisian corvids with similar ecological niche and feeding behaviour (including scavenging) might also be good candidates as sentinel species for WNV infection. Indeed, follow-up surveys of sentinel birds are widely used to detect low-noise transmission of WNV. In the Mediterranean basin, virology and serology surveys in sentinel chicken have provided good results in Egypt [Soliman et al., 2010] and Greece [Chaskopoulou et al., 2011]. In Tunisia, it might be implemented in the high-risk areas identified in this study: Jendouba, Bizerte, Nabeul, Sousse, Monastir, Sfax, Medenine, and Djerba (Figure 22). Also, virus point prevalence surveys can be used to detect WNV in wild avifauna. It was implemented in Tunisia, in the frame of avian influenza surveillance [Gaidet et al., 2007]. However, this method is expensive and cannot be widely used. It might be considered in specific situations, when WNV transmission risk is high, for instance after heavy rainfall or when huge mosquito proliferation is observed.

Chapitre 3. Compréhension de l'histoire naturelle du virus West Nile en Tunisie

1 Incidence sérologique de la fièvre West Nile chez des poulets sentinelles

Un animal sentinelle est choisi dans son milieu, ou placé volontairement dans un milieu à surveiller, et suivi au cours du temps afin de détecter précocement une exposition qualitative ou quantitative à un agent pathogène donné [Toma, 2009]. L'idée est ancienne : selon la légende, en 390 avant JC, les oies sacrées du Capitole de Rome donnèrent l'alerte, sauvant la ville d'une invasion gauloise. Ce rôle d'alerte trouve une application dans des domaines variés, les dangers biologiques (viraux, bactériens, parasitaires) constituant actuellement les risques principaux pour la santé humaine [Dropsy, 2010].

Dans la mesure où les oiseaux interviennent dans le cycle du VWN, l'objectif principal de leur utilisation est de détecter la circulation du VWN dans des zones identifiées comme étant à haut risque d'introduction virale. Nous avons utilisé des poules (*Gallus gallus domesticus*) sentinelles dans cette étude, car cette espèce satisfait à la plupart des conditions indiquées ci-dessus, et nous semblait être un bon choix pour répondre aux objectifs de recherche : identification des endroits et périodes de circulation virale, et possibilité de mise en évidence du VWN lui-même.

1.1 Matériel et méthodes

Les poulaillers sentinelles ont été mis en place à la fin septembre 2010 dans 5 sites pour déterminer les périodes de circulation virale et l'incidence saisonnière de la FWN chez ces oiseaux. Une équipe de vétérinaires, techniciens et chauffeurs a été mobilisée pour réaliser ce suivi. Cinq sites ont été identifiés (Figure 23) dans des biotopes riches en vecteurs et en oiseaux sauvages, notamment migrateurs, et / ou dans des sites où le virus avait été précédemment identifié, par une forte prévalence sérologique chez des équidés, ou l'occurrence de cas cliniques chez l'homme. Ce nombre de sites était le maximum possible compte tenu des moyens disponibles.

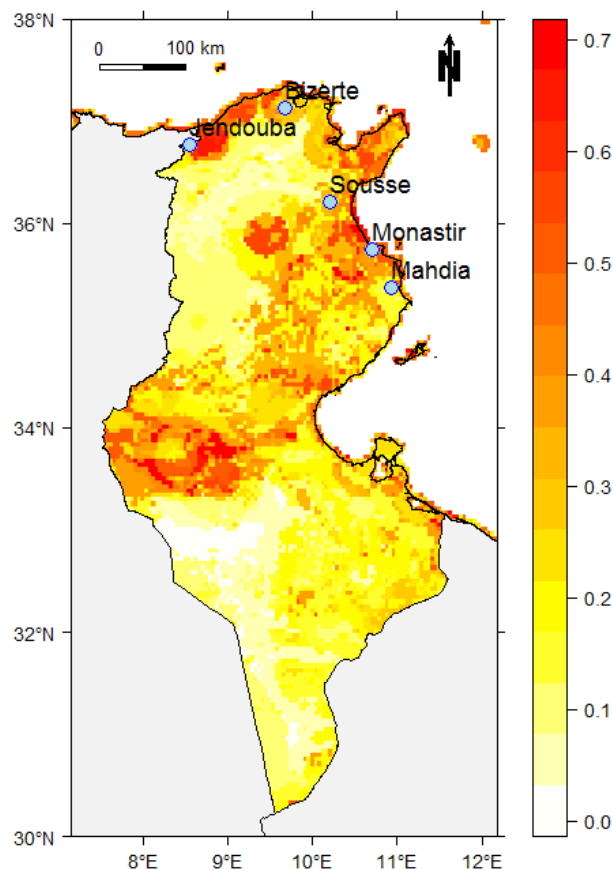


Figure 23. Localisation des poulaillers sentinelles implantés en Tunisie (points bleus). Le fond de carte est la probabilité de prévalence sérologique chez les chevaux prédite par inférence multi-modèle en fonction de variables environnementales. L'échelle colorée à la droite du graphe donne la valeur des probabilités correspondant à la couleur.

A Jendouba, les poules étaient placées chez un agriculteur dont un membre de la famille avait été atteint de la FWN en 2010. A Bizerte, elles étaient chez un agriculteur résidant sur la montagne d'Ichkeul, l'un des principaux sites RAMSAR du nord de la Tunisie. A Sousse, elles ont été mises au *Parc zoologique Friguia*. A Monastir et à Medhia, elles ont été placées chez des agriculteurs.

Les poules utilisées ont été achetées dans un élevage commercial de Sidi Thabet, près de Tunis. Elles étaient âgées de 4 semaines au début de l'étude. Elles ont été baguées individuellement et testées avec un test ELISA (ID-Screen West Nile competition, IDVET) pour la présence d'anticorps circulant contre le VWN afin d'éliminer les animaux présentant des anticorps. Elles ont reçu des vaccinations préventives contre les maladies courantes (maladie de Gumboro et de Newcastle). Les poules ont été gardées en

captivité (50 poules par site) dans des cages permettant l'entrée et la sortie des moustiques tout en offrant une protection contre les prédateurs naturels. Le rythme de prélèvements était mensuel à partir d'octobre 2010. Un prélèvement sanguin était effectué sur tube sec à partir de la veine sous-alaire pour la sérologie et un écouvillonnage cloacal pour la RT-PCR de détection du VWN. Les poules mortes ou séropositives pour le VWN étaient remplacées pour conserver une puissance statistique optimale.

La procédure de laboratoire est résumée sur la Figure 24. Dans les échantillons collectés, nous avons dépisté la présence d'anticorps dirigés contre les protéines de surface E du VWN par ELISA de compétition (ID-Screen West Nile competition, IDVET). L'ELISA utilisé pour cette enquête avait auparavant été validé par le fabricant pour les études de l'avifaune.

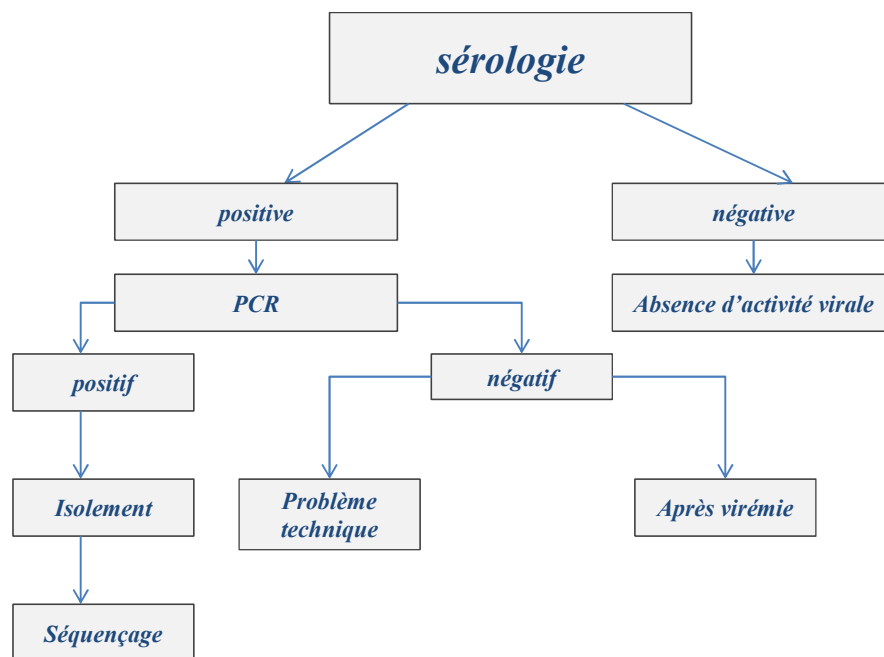


Figure 24. Schéma de procédure du diagnostic de la fièvre West Nile chez les poules sentinelles

Une méthode de RT-PCR quantitative a été utilisée pour la mise en évidence de l'ARN viral à partir des écouvillons cloacaux et des cerveaux de poules en utilisant le kit ADIAVET™ WEST NILE. La détection du génome viral par RT-PCR a été réalisée pour les animaux préalablement trouvés séropositifs en ELISA (les prélèvements qui ont été effectués en même temps). L'extraction d'ARN a été effectuée sur des colonnes de silice en utilisant un kit commercial (QIAamp® Viral RNA Mini Kit). L'ARN extrait a ensuite

été conservé à -80°C. Le principe de la méthode RT-PCR quantitative avec le kit ADIAVET™ WEST NILE repose dans un premier temps sur la transcription inverse (RT) de l'ARN en ADN complémentaire. L'ADNc obtenu est dans un second temps amplifié (PCR) par une ADN polymérase qui utilise des amorces spécifiques. Les deux réactions enzymatiques se font dans un seul tube (One-step RT-PCR). Les produits amplifiés sont détectés grâce au marquage spécifique de sondes d'hydrolyse (technologie 5'-exonucléase). Le kit peut détecter simultanément i) le VWN (sonde marquée en FAM) ii) la β -actine, un contrôle interne d'extraction et d'amplification spécifique des ARN endogènes (sonde marquée avec un fluorochrome lu dans le même spectre que VIC et HEX). Le témoin positif est fourni avec le kit. Pour chaque analyse, on utilise 5 μ l d'ARN par puits. Afin de s'assurer de l'absence d'inter-contamination, un témoin négatif est intégré à chaque série d'extraction. Ce témoin négatif est constitué) partir d'eau physiologique.

La région cible de l'amplification est la région 5'UTR du génome du VWN. Les tubes réactionnels ont été incubés dans un thermocycleur selon le programme suivant : 10 min à 45°C puis 10 min à 95°C, suivis de 45 cycles de 15 s à 95°C et de 1 min à 60°C.

Pour l'interprétation des résultats de RT-PCR, la ligne de base correspond au bruit de fond de la fluorescence et qualifie la partie non caractéristique des courbes observées pendant les premiers cycles de l'amplification. La courbe d'amplification caractéristique qualifie la présence d'une courbe de fluorescence avec une phase exponentielle, suivie d'une phase linéaire et se terminant par une phase de plateau (ordonnées en échelle logarithmique). Toute courbe ne présentant pas cet aspect sera considérée comme non caractéristique, comme par exemple une courbe aplatie, en dents de scie ou trop tardive pour en observer à minima la phase linéaire.

La ligne de seuil doit être placée au-dessus de la ligne de base, de préférence au point d'inflexion de la phase exponentielle d'amplification (ordonnées en échelle linéaire) ou au milieu de la partie linéaire (ordonnées en échelle logarithmique) commune à l'ensemble des courbes d'amplification caractéristiques.

Le cycle seuil (Ct) d'un puits correspond, pour chaque fluorophore détecté, au point d'intersection de la ligne de seuil avec la courbe de fluorescence. La valeur de Ct exprimée par l'appareil pour chaque puits dépend de la position de la ligne seuil et de la

charge d'analytes initialement présents dans le tube PCR. L'amplification a été validée si les résultats suivants ont été obtenus pour les témoins (Tableau 8) :

Témoins	Témoin réactif	Témoin positif	Témoin négatif
Amplification FAM	Non	Oui	Non
Amplification VIC/HEX	Non	Oui	Non
Validation	Absence de contamination	Amplification de la cible	Absence de contamination

Tableau 8: Procédure de validation de l'amplification virale

L'échantillon est considéré comme négatif si une courbe d'amplification caractéristique (CAC) est observée en VIC ou HEX sans qu'il y ait de CAC en FAM

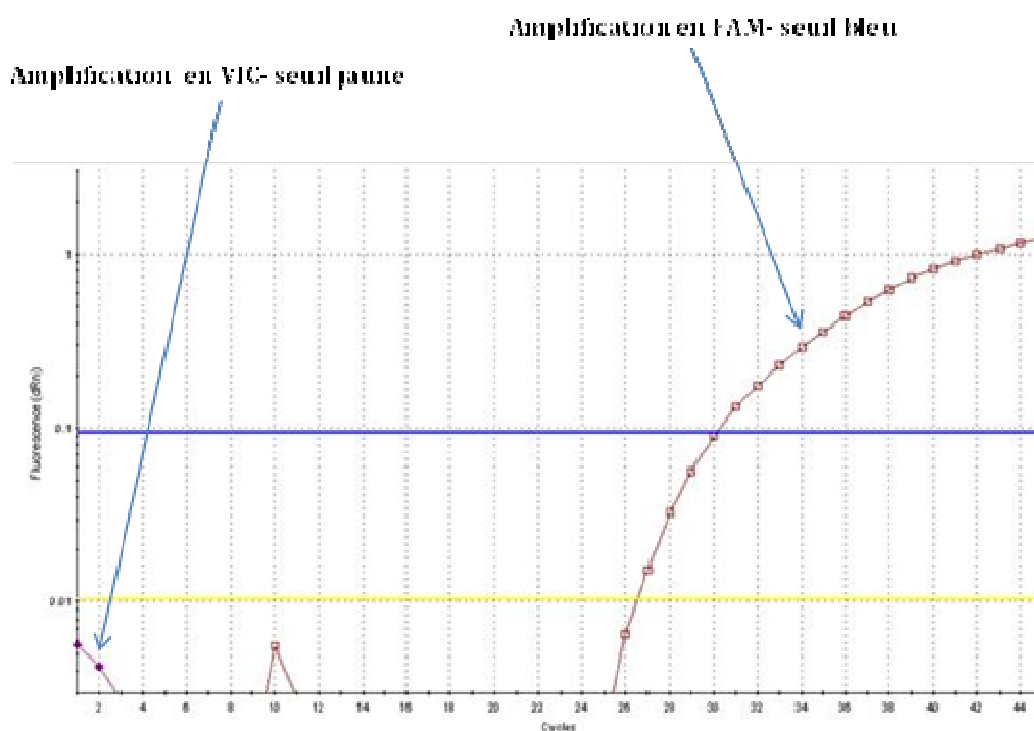


Figure 25. Exemple B : échantillon positif pour le virus West Nile sans contrôle interne

L'échantillon est considéré comme positif si une CAC est observée en FAM (Tableau 8). Le témoin interne peut être co-amplifié (Figure 25). L'absence totale de CAC pour un échantillon indique une déficience de l'extraction de l'ARN (perte ou destruction de

l'ARN) ou une RT-PCR temps-réel défectueuse (présence d'inhibiteurs dans l'échantillon, erreur de programme ou absence d'échantillon). Dans ce cas, il faut refaire le test en utilisant l'extrait d'ARN pur et dilué au 1/10ème dans de l'eau nuclease-free et si le test n'est toujours pas validé, une nouvelle extraction de l'ARN total de l'échantillon doit être réalisée.

Exemple	A	B	C	D
Amplification FAM	Non	Oui	Oui	Non
Amplification VIC/HEX	Oui	Non	Oui	Non
Résultat	négatif	positif	positif	à refaire

Tableau 9: Interprétation des résultats de RT-PCR pour le virus West Nile

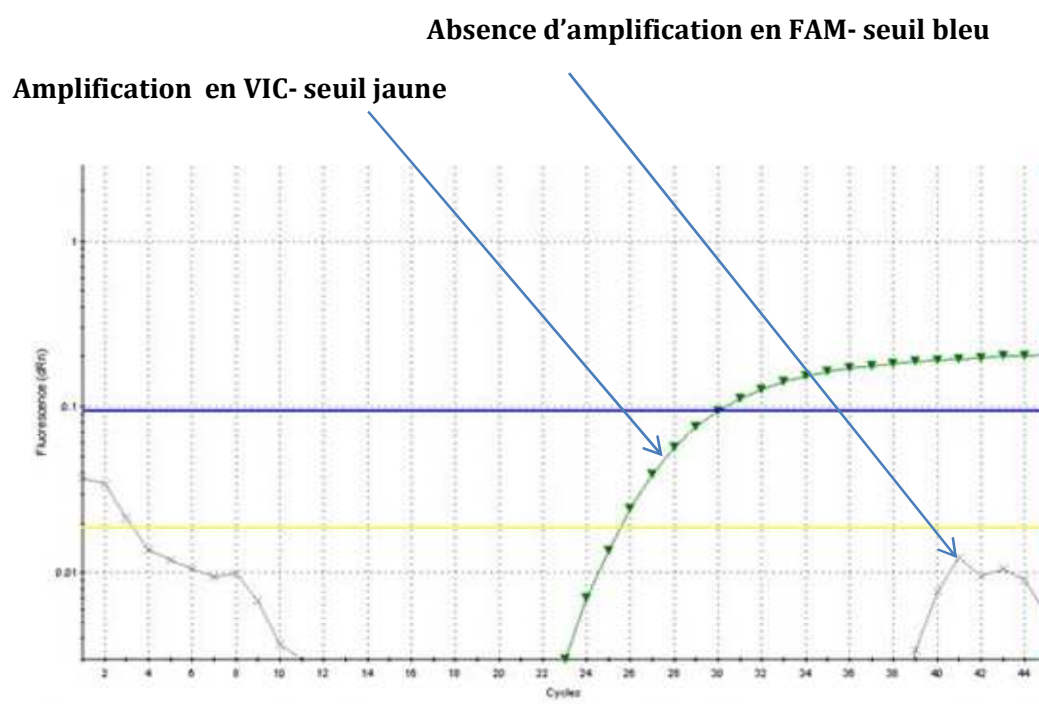


Figure 26. Exemple A : échantillon négatif pour le virus West Nile

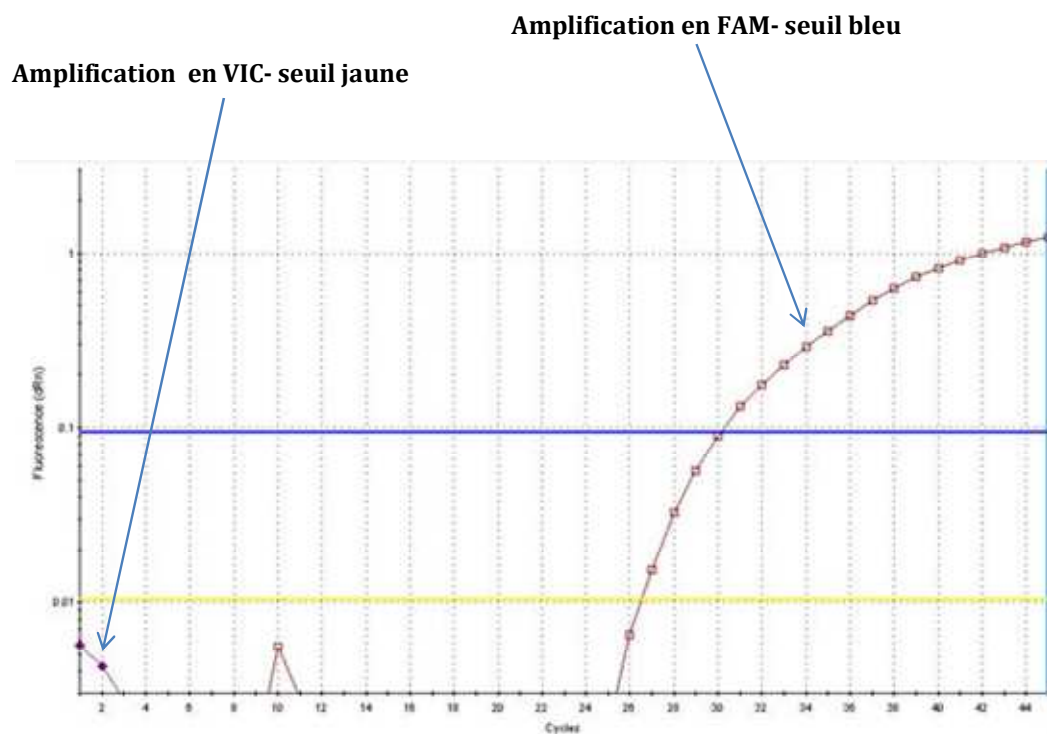


Figure 27. Exemple B : échantillon positif pour le virus West Nile sans contrôle interne

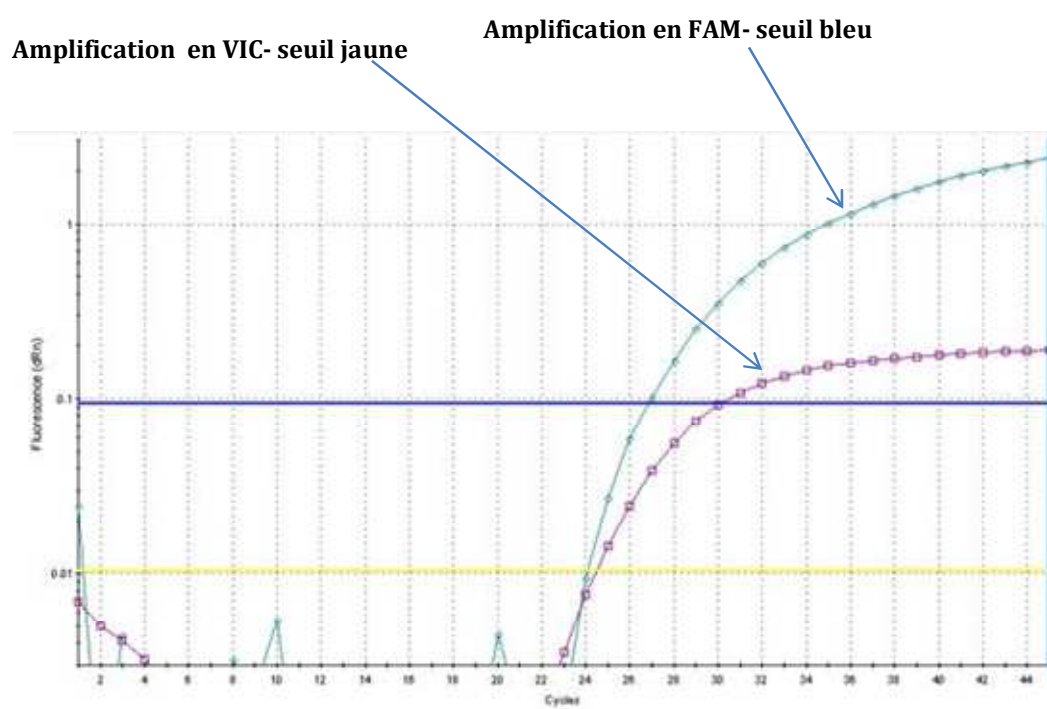


Figure 28. Exemple C : échantillon positif pour le virus West Nile avec contrôle interne

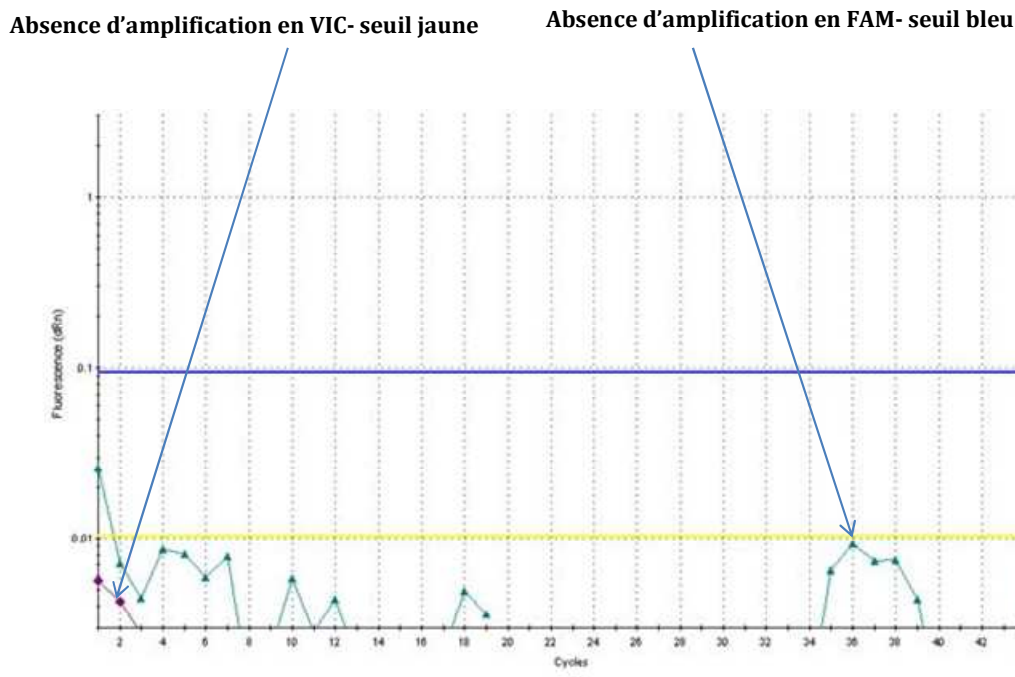


Figure 29. Exemple D : échantillon inhibé pour le détection du virus West Nile

Pour l'analyse des données, le taux mensuel d'incidence sérologique a été estimé par le ratio $\pi = y / n'$, avec y le nombre de séroconversions, et $n' = n - m / 2$, n étant l'effectif initial en début de mois, et m le nombre de morts au cours du mois. L'intervalle de confiance du taux mensuel a été estimé par approximation normale de la loi binomiale pour les mois où l'incidence était non nulle, et par le test exact de Fisher dans le cas contraire. Les taux d'incidence par période de p mois consécutifs ont été estimés par la formule $I_p = 1 - \prod_{i=1}^p (1 - \pi_i)$.

On a supposé une distribution binomiale du taux d'incidence par période, avec approximation normale de la loi binomiale pour l'estimation de l'intervalle de confiance.

1.2 Résultats

Durant les premier mois de l'étude, des mortalités mensuelles de l'ordre de 4 à 9 % ont été enregistrées dans chaque site, en relation avec les conditions climatiques et d'entretien des poules (Figure 30). Aucune poule n'a montré de signe clinique de FWN

durant l'étude. Durant les mois de janvier à juillet 2011, l'enquête a été suspendue en raison de la situation socio-politique en Tunisie.

Les poulaillers sentinelles ont été renouvelés durant le mois d'août 2011 et le rythme des prélèvements a repris normalement. De novembre 2011 à août 2012, il n'y a pas eu de séroconversion. Une mortalité de 3 à 7 % par mois a été enregistrée jusqu'en décembre 2011. De janvier à mars 2012, les conditions climatiques au nord-ouest de la Tunisie (Jendouba) ont été exceptionnelles avec une vague de froid accompagnée de fortes chutes de neige ayant atteint deux mètres de hauteur dans certaines régions du gouvernorat. A cause de cette vague de froid, toutes les poules sentinelles sont mortes.

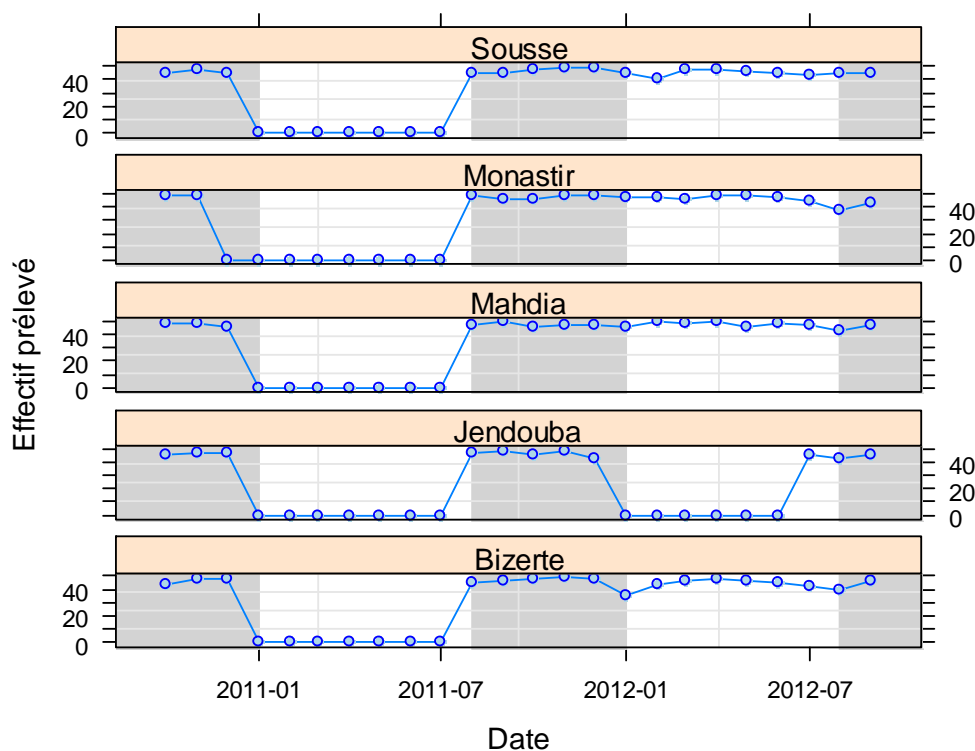


Figure 30. Période de suivi et effectif des poulaillers sentinelles pour l'étude de la transmission du virus West Nile en Tunisie. Les trois périodes grisées représentent les périodes estivales et automnales (août à décembre) pendant lesquelles des séroconversions ont été observées.

Aucune séroconversion n'a été observée entre janvier et juin au cours des 2 années de suivi. On a décidé de calculer des taux d'incidence estivo-automnale (août à décembre) car cette saison correspond aux pluies d'automne et d'hiver, et consécutivement aux

périodes de prolifération maximale des moustiques. De plus, c'est également la période de passage des oiseaux migrateurs nicheurs paléarctiques.

Sept poules sentinelles ont montré des séroconversions estivo-automnales (Figure 31), détectées par ELISA à Jendouba (taux d'incidence estivo-automnale de 6%, IC 95% [0 ; 14]) et Monastir (taux d'incidence automnale de 8%, IC 95% [1 ; 16]) durant le mois d'octobre 2011, et 3 poules à Monastir durant le mois de septembre 2012 (taux d'incidence estivo-automnale de 7%, IC 95% [0 ; 14]). Les 10 poules ayant présenté une séroconversion ont été sacrifiées et leurs cerveaux ont été analysés par RT-PCR. Les résultats ont tous été négatifs.

D'autre part, toutes les poules mortes durant l'étude ont subi une autopsie et un prélèvement de cerveau a été effectué pour recherche du génome viral. Tous les prélèvements ont été négatifs avec le test RT-PCR.

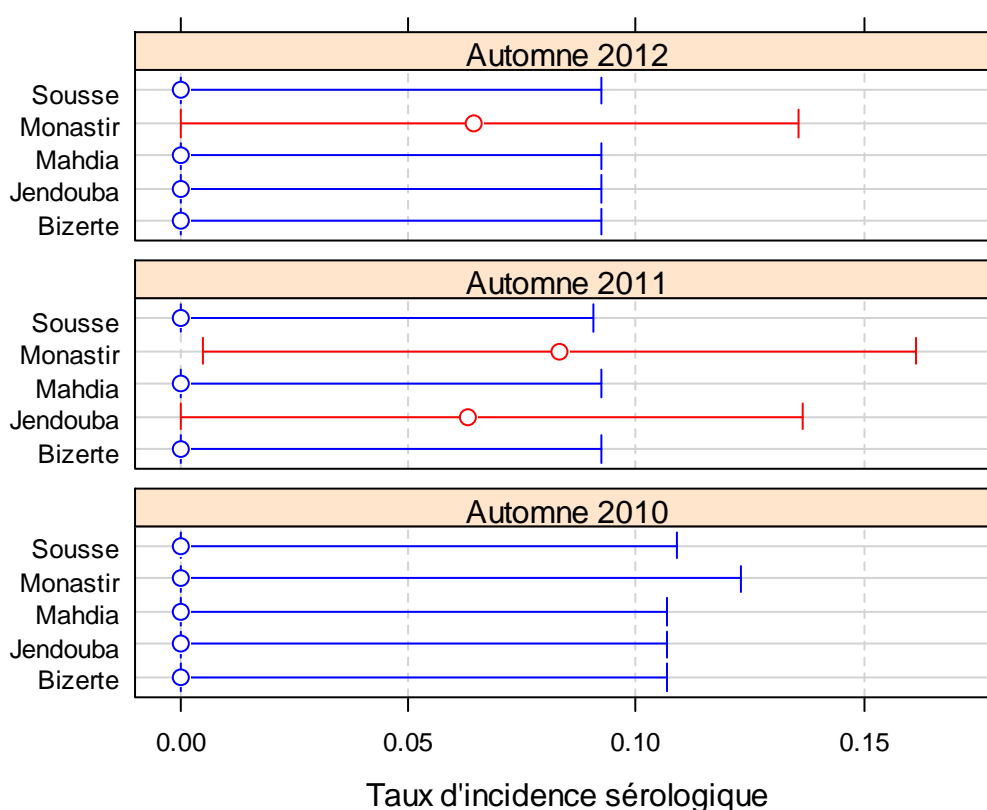


Figure 31. Taux d'incidence sérologique de la fièvre West Nile et intervalle de confiance à 95% observés en période estivo-automnale dans les poulaillers sentinelles en Tunisie. Le taux d'incidence est représenté par un point bleu ou rouge, et l'intervalle de confiance à 95% par un segment bleu ou rouge. La couleur rouge a été utilisée pour représenter les taux d'incidence > 0.10.

1.3 Discussion

Dispositif et résultats

Le but principal du suivi de poules sentinelles était la détection de l'activité du VWN dans les sites choisis. Pour atteindre cet objectif, les sites de surveillance ont été choisis là où ont été identifiés des taux élevés de suite à l'enquête nationale chez les équidés de Tunisie ou des clusters de cas pendant les épidémies de 1997 et 2003. Ces zones sont connues pour abriter une activité vectorielle importante et héberger de nombreux oiseaux migrateurs. Cependant, la lourdeur de mise en œuvre d'un système de poulaillers sentinelles nous a imposé de réduire le nombre de sites à 5 et de les répartir uniquement dans les zones les plus à risques.

Le choix du lieu précis de mise en place des poules sentinelles est la clé de la réussite. En effet, elles doivent être élevées à proximité des sites d'activité et de reproduction des moustiques. En Floride, une étude a montré que les poules étaient plus susceptibles d'être infectées par un arbovirus si elles étaient placées dans un endroit ouvert [Morris et al., 1994]. Une autre étude a montré que l'habitat favorable aux moustiques à proximité des poulaillers représentait le facteur le plus important pour le taux de transmission virale chez les sentinelles. Certains programmes de surveillance ont choisi de garder les poules séparées dans des cages individuelles maintenues au-dessus du sol pour éviter l'attaque des prédateurs. D'autres ont choisi de garder les poules ensemble dans la même cage pour permettre le contact social entre elles tout en les maintenant au niveau du sol avec un abri pour dormir [Komar, 2001]. Il n'y avait pas de différence significative de séroconversions entre les deux systèmes. Nous avons opté pour un regroupement dans une seule cage au sol pour faciliter les manipulations et l'entretien des poules.

Certains programmes de surveillance par des oiseaux sentinelles ont choisi de placer les cages dans des sites urbains (loin du cycle rural), de telle sorte qu'un cas d'infection déclencherait une alerte pour le risque de transmission à l'homme [Kwan et al., 2010]. Cette stratégie peut entraîner une détection tardive de l'infection et une sous-estimation des risques dans les régions rurales proches du cycle entre moustiques et oiseaux sauvages. Il ne pourrait pas être utilisé seul en Tunisie où la grande majorité des malades de l'épidémie 1997 vivaient en milieu rural : les grandes villes et chefs-lieux des

gouvernorats (Sousse, Mahdia, Sfax et Monastir) ont été épargnées ; la même situation a été rencontrée en 2003 et 2010.

D'autres facteurs peuvent influencer le succès des sentinelles comme l'attractivité relative des espèces sentinelles pour les vecteurs, et la taille du troupeau. Pour qu'une espèce d'oiseaux soit candidates à être sentinelle pour la surveillance de VWN, elle devait remplir les critères suivants :

- Elle doit être un hôte attractif pour les moustiques présents, et être réceptive à l'infection transmise par les moustiques. Il s'avère que les vecteurs de VWN (*Aedes* spp., *Anopheles* spp. *Culex* spp.) sont compétents pour les poules domestiques [Rizzoli et al., 2007].
- Elle doit résister à l'infection et développer des anticorps détectables. Des poules ont été inoculées (i) par voie parentérale, (ii) par les moustiques, et (iii) par voie orale. Les résultats ont été favorables que ce soit pour la réceptivité à l'infection, le développement d'anticorps, l'ampleur et la durée de la virémie et le potentiel d'excrétion virale [Parks et al., 1958].
- Une fois infectée, elle ne doit pas développer de virémie suffisante pour infecter les moustiques qui la piquent afin de ne pas contribuer au cycle d'amplification virale et augmenter le risque d'infection des autres espèces présentes à proximité, y compris l'Homme. Il a été démontré que la virémie observée chez la poule domestique (*Gallus gallus domesticus*) est insuffisante pour transmettre le VWN à *Cx. pipiens* [Langevin et al., 2001].
- Elle ne doit pas permettre d'infecter directement les autres hôtes du groupe (ce qui fausserait l'évaluation du risque de transmission du VWN par les moustiques) ou bien les humains les manipulant. En revanche, les poules peuvent excréter le virus par la voie digestive [Langevin et al., 2001] ce que justifie l'utilisation d'un écouvillon cloacal pour détection du génome virale mais constitue un risque de surestimation du risque de transmission par les moustiques.

Les poules sentinelles ont été utilisées pour évaluer la transmission du VWN aux USA et au Canada [Morris et al., 1994]. En Roumanie, la surveillance du VWN avec les poulets sentinelles a été utilisée à la suite de l'épidémie de 1996 [Cernescu et al., 2000b], et le système est actuellement utilisé avec succès en Grèce [Chaskopoulou et al., 2011]. Beaucoup d'autres systèmes de surveillance ont eu recours à l'utilisation de volailles ou

de canards, en Afrique du Sud, en Australie, en France, en Italie... [Calistri et al., 2009b, Hars et al., 2008, Komar, 2001]. En Europe du Sud, la survenue de foyers irréguliers, difficilement prédictibles, a poussé à établir des programmes de surveillance multidisciplinaires reposant sur la surveillance passive des infections neuro-invasives chez l'homme et le cheval et sur le suivi sérologique d'oiseaux sentinelles, à l'image de ce qui a été proposé en France ou en Italie depuis le début des années 2000 [Hars et al., 2008].

En Californie, le système de poules sentinelles s'est avéré plus sensible et moins coûteux pour la détection de l'activité virale [Langevin et al., 2001] en comparaison avec les systèmes de surveillance utilisant les oiseaux sauvages qui présentent des inconvénients tels que la difficulté de détermination de l'âge des animaux, de leur statut immunitaire à l'arrivée dans l'écosystème cible, et le manque d'information sur leur capacité à développer des anticorps anti-VWN détectables au laboratoire [Hurlbut et al., 1956].

D'autres espèces d'oiseaux d'élevage que les poules ont été utilisées comme sentinelles pour la surveillance des arbovirus, y compris les Faisans colin de Virginie (*Callipepla Virginiasus*) [Morris et al., 1994], les Cailles japonaises (*Coturnix japonica*) [Williams et al., 1971], les Pigeons (*Columba livia*) [Reisen et al., 1992], et les Canards (*Anas platyrhynchos*). Les poules sont souvent utilisés comme des sentinelles pour la surveillance des encéphalites à arbovirus transmis par des oiseaux pour les raisons mentionnées plus haut [Morris et al., 1994].

Des mammifères ont également été utilisés comme sentinelles pour la surveillance du VWN : chevaux [Monath et al., 1985], chiens [Takeda et al., 1998], lapins [Pinger et al., 1975] et hamsters [Ventura et Ehrenkranz, 1975]. Les mammifères sentinelles pourraient mieux indiquer le risque de transmission du VWN aux mammifères, alors que les oiseaux sentinelles seraient mieux appropriés pour évaluer le risque de transmission de ce virus aux oiseaux.

L'âge des sentinelles est important car les animaux doivent supporter les conditions d'élevage et leur système immunitaire doit être suffisamment développé pour produire des anticorps détectables. Ainsi, des poules de 2 semaines d'âge ont été utilisées dans le système de surveillance en Italie [Rizzoli et al., 2007] alors que dans notre études les poules utilisées avaient 4 semaines d'âge au début du suivi.

Le rythme de prélèvement est également important, surtout si l'objectif est de déterminer précisément les périodes d'infection tout en se donnant le maximum de chance de mettre en évidence le génome viral, voire d'isoler le virus. Un rythme mensuel a été adopté lors de l'étude publiée en Egypte en 2010 [Soliman et al., 2010]. En Italie le rythme a été d'une fois tous les 15 jours [Rizzoli et al., 2007]. En Grèce, le rythme était même hebdomadaire [Chaskopoulou et al., 2011], ce qui a permis de mettre en évidence le génome viral dans le sérum des oiseaux.

Pour des raisons logistiques le rythme de prélèvement a été de d'1 fois par mois en Tunisie, car une fréquence plus élevée aurait impliqué des coûts incompatibles avec le budget disponible. Cette fréquence faible, associée à une incidence sérologique relativement basse par rapport à celle observée en Grèce [Chaskopoulou et al., 2011] et à une virémie peu persistante chez la poule, a vraisemblablement été la raison de l'absence de détection du VWN dans les échantillons issus des poules sentinelles en Tunisie.

Conséquence des résultats obtenus pour la surveillance

L'objectif principal de l'utilisation du système d'oiseaux sentinelles en captivité était de détecter l'activité du virus dans les sites retenus. Deux sites (Monastir et Jendouba) parmi les 5 retenus ont connu une séroconversion pendant le mois d'octobre 2011 et un site (Monastir) pendant le mois de septembre 2012.

L'absence d'estimation de l'âge chez les équidés échantillonnés lors de l'étude sérologique transversale réalisée en 2009 dans les régions de Jendouba et Monastir nous a empêchés de faire une estimation de l'incidence annuelle moyenne sur la période antérieure à 2009. Lors d'études sérologiques ultérieures chez les équidés de Tunisie, il serait important de relever l'âge des animaux de manière à faire cette estimation, et à évaluer la régularité de la transmission annuelle [Chevalier et al., 2006].

Comparé à d'autres systèmes de surveillance, le taux d'incidence était inférieur aux taux enregistrés en 1997 chez 160 poules sentinelle dans la ville de Bucarest en Roumanie (16-40%) [Komar, 2001]. Par contre le taux était supérieur à celui enregistré chez les poules sentinelles dans la région du sud du Sinaï (4%) et la région du bas d'Egypte (5%) [Soliman et al., 2010]. A cet égard, la taille n de l'échantillon d'animaux sentinelles est importante pour obtenir une sensibilité correcte du système de surveillance. Pour un risque de première espèce α et un taux d'incidence P et en supposant l'indépendance

des observations, un calcul élémentaire montre que la taille de l'échantillon devrait être $n = \log(\alpha) / \log(1 - P)$. Dans notre étude, le nombre de poules par site a été fixé à 50 pour des raisons logistiques et financières. Il s'en suit qu'avec un risque de première espèce de 5%, nous avons 95% de chances de détecter une incidence mensuelle de 6%. Or, les incidences mensuelles non nulles observées à deux occasions à Jendouba et Monastir étaient égales ou à peine supérieures à ce seuil. Il est donc possible que le VWN ait circulé dans les autres sites avec un taux d'incidence mensuelle inférieur à 6%, sans avoir été détecté faute de puissance statistique suffisante. En conséquence, si un système de poulaillers sentinelles devait être retenu pour le réseau de surveillance West Nile en Tunisie, il faudrait réfléchir au seuil d'incidence que l'on souhaiterait détecter : une incidence mensuelle de 6% correspond à un rythme annuel de 52%.

L'enquête a montré qu'il y a eu une transmission du virus en octobre 2011 dans les régions de Monastir et Jendouba, préalablement identifiées comme des régions à haut risque de transmission du VWN chez les équidés (Figure 23). La détection des anticorps étant possible à partir du 15^e jour après l'infection, on peut affirmer que l'infection virale s'est produite pendant la deuxième quinzaine du mois du septembre, ce qui coïncidait avec la période des deux épidémies de 1997 et de 2003. Durant cette période, les moustiques du genre *Culex* et *Aedes* étaient actifs dans ces régions.

Les résultats ont montré que le cycle oiseaux – moustiques s'est établi avec un « débordement » viral chez l'homme puisque des cas cliniques ont été enregistrés en 2011 et 2012. Cela prouve l'utilité potentielle du système d'oiseaux sentinelles dans un système national de surveillance de la FWN. Ce phénomène a été souvent observé dans plusieurs pays en Europe (Espagne, Autriche, Portugal) [Komar, 2001]. L'utilisation d'oiseaux sentinelles a également permis de détecter précocement la circulation virale, lors de l'épisode en Camargue (France) de 2004. Entre fin août et novembre 2004, le virus a été responsable de 32 cas de méningo-encéphalites chez les chevaux dans cette région. Le réseau de surveillance active aviaire a permis, lors de cet épisode, la détection de la première séroconversion aviaire un mois avant les premières suspicions cliniques équine, démontrant l'intérêt de ce système pour l'alerte précoce.

Pourquoi aucun cas clinique n'a-t-il été observé chez les mammifères et les oiseaux dans les deux régions de Monastir et Jendouba. La faible incidence sérologique observée chez les oiseaux sentinelles laisse penser que le cycle d'amplification virale entre oiseaux et

moustiques n'était pas assez intense pour que les hôtes accidentels Cheval ou Homme ne soient touchés par débordement du cycle viral. Cependant, des cas humains ont été enregistrés durant la même période dans le sud tunisien (région des Chotts) avec 3 cas en 2011 et 13 cas en 2012.

Une deuxième hypothèse est que les souches virales étaient peu virulentes pour les mammifères. En effet, les cas humains évoqués ont été observés chez des femmes âgées de plus de 70 ans. Malgré leur âge, l'évolution clinique a été favorable et sans séquelle, ce qui pourrait confirmer que la souche de VWN était assez peu pathogène.

Enfin, la densité des moustiques et leur capacité vectorielle n'auraient pas atteint un niveau suffisant pour provoquer des foyers dans les populations humaines et équine dans les régions du Nord et du Sahel, contrairement au sud tunisien où la météorologie aurait été favorable à la pullulation des moustiques durant cette période.

1.4 Conclusion

L'existence de cas humain corrélativement à l'observation de séroconversions dans deux sites sentinelles nous a permis de conclure que le système de surveillance par des poules sentinelles permettait de mettre en évidence une circulation même relativement faible du VWN. Les effectifs de sentinelles mises en place ne permettaient toutefois pas d'affirmer que le VWN n'a pas circulé dans les autres sites avec une incidence estivo-automnale inférieure à 6%. Si le système de poules sentinelles était retenu pour la surveillance du VWN en Tunisie, il serait nécessaire de réfléchir aux effectifs de chaque poulailler sentinelle et au maillage du territoire (surtout au sud) afin d'obtenir une meilleure sensibilité que celle observée dans cette étude.

Les résultats obtenus ont cependant confirmé que Monastir et Jendouba étaient deux zones favorables à la transmission du VWN, en cohérence avec les résultats de l'enquête sérologique transversale chez les équidés de Tunisie. L'activité virale observée dans ces deux sites s'est déroulée en fin de saison chaude (septembre, octobre) et à proximité de zones humides, à un moment de forte reprise de l'activité des moustiques, et de présence de grandes concentrations d'oiseaux sauvages.

2 Enquête sérologique sur l'avifaune sauvage et domestique

En Tunisie, les oiseaux migrateurs sont communément considérés comme responsables de l'introduction du VWN [Triki et al., 2001] mais aucune investigation n'a été menée jusqu'à présent. Pour combler partiellement cette lacune, nous avons estimé la prévalence sérologique sur un échantillon d'oiseaux capturés en période migratoire, parmi les espèces migratrices et sédentaires de Tunisie, ainsi que sur des poules domestiques (*Gallus gallus domesticus*) élevées en divagation à proximité des zones fréquentées par les oiseaux sauvages.

2.1 Matériel et méthodes

Deux sites d'étude ont été choisis (Figure 32) : le Parc National d'Ichkeul et la sebkha Sahline.

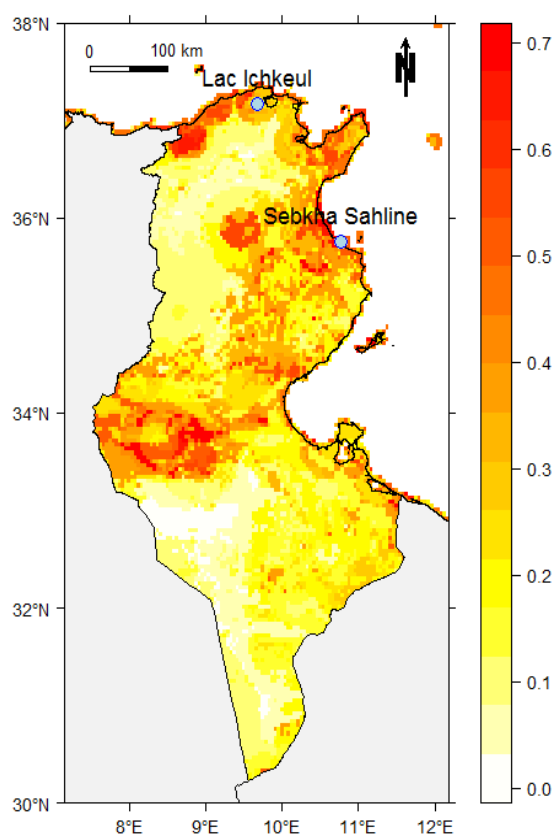


Figure 32. Sites d'étude de la fièvre West Nile chez les oiseaux domestiques et sauvages de Tunisie. Le fond de carte est la probabilité de prévalence sérologique chez les chevaux prédite par inférence multi-modèle en fonction de variables environnementales. L'échelle colorée à la droite du graphe donne la valeur des probabilités correspondant à la couleur.

Le premier est situé au nord-ouest de la Tunisie. Il appartient à la zone subhumide tempérée entre le front polaire et le front des alizés avec une pluviométrie moyenne annuelle de 600 mm et une température moyenne annuelle de 18°C. Cet écosystème est composé de 3 unités interconnectées : le lac, les marais et la montagne. A l'Est, le chenal de Tinja permet la communication entre le Lac Ichkeul et la lagune de Bizerte, elle-même en relation directe avec la Mer Méditerranée par un chenal artificiel. Le Lac Ichkeul est caractérisé par une grande richesse et diversité naturelle faunistique et floristique [Azafzaf et Feltrup-azafzaf, 2009].

La sebkha de Sahline est un système anthropisé jouxtant l'aéroport de Monastir. La région de Monastir est située dans l'étage bioclimatique semi-aride à hiver doux et pluvieux, et à été chaud et sec. L'hygrométrie est relativement stable tout au long de l'année mais la période estivale est marquée par une forte évaporation. La pluviométrie moyenne annuelle est d'environ 300 mm. Les températures journalières varient de 10°C à 13°C en janvier et de 36°C à 38°C en août.

La campagne de prélèvements s'est déroulée en novembre et décembre 2011. Nous avons échantillonné les espèces présentes à cette période selon des critères techniques (espèces faciles à capturer et à prélever) et épidémiologiques. Deux groupes d'oiseaux ont été sélectionnés :

- des oiseaux migrateurs susceptibles d'introduire le virus,
- des oiseaux sédentaires, éventuellement domestiques, trouvés à proximité des habitations humaines, potentiellement amplificateurs et disséminateurs du virus, et marqueurs du risque pour l'homme et les mammifères domestiques.

Tous les oiseaux de Bizerte étaient des poules domestiques alors qu'à Monastir, l'échantillon était constitué à 90% d'oiseaux sauvages. Les prélèvements ont concerné un total de 75 poules, dont 65 ont été prélevées dans 13 élevages situés autour du lac d'Ichkeul et 10 chez deux éleveurs de la région de Sahline. Un total de 89 oiseaux a été capturé autour de la Sebkha de Sahline. Les oiseaux ont été capturés par une méthode classique [Gaunt AS, 1997] et à l'aide de filets japonais.

Les prélèvements de sang (0,4 à 0,8 mL) ont été effectués à la veine sous-alaire. Pour assurer la coagulation, le sang était transféré dans des tubes secs et incubé pendant 18 h à température ambiante (18-22°C). Après centrifugation (1.300 g, 10 minutes, 4°C), les

sérums étaient transférés dans des micro-tubes stériles sous un poste de sécurité microbiologique, puis conservés à -20°C jusqu'à leur utilisation.

Sur chaque oiseau, un écouvillonnage cloacal a été effectué pour recherche virale. Les prélèvements ont été transportés sans rupture de la chaîne du froid au laboratoire où ils ont été conservés à -80°C .

Nous avons testé la présence d'anticorps dirigés contre le VWN dans les échantillons collectés par un ELISA de compétition (ID-Screen West Nile), identique à celui utilisé dans l'enquête sérologique chez les chevaux. Une méthode de RT-PCR quantitative a été utilisée pour la mise en évidence de l'ARN virale à partir des écouvillons en utilisant les mêmes kits et protocole que pour les poulets sentinelles. Les taux de séroprévalence sérologiques, leurs intervalles de confiance et les tests associés ont été estimés à l'aide de modèles de régression logistique sous l'hypothèse de distribution bêta-binomiale des proportions [Griffiths, 1973]. Le taux de corrélation intra-groupe a été estimé selon un modèle d'analyse de variance [Donner, 1986].

2.2 Résultats

Les taux de séroprévalence observés sont dans le Tableau 10 (oiseaux migrateurs) et le Tableau 11 (oiseaux domestiques et péri-domestiques). Sur la totalité des sujets étudiés, 49 se sont révélés positifs soit une séroprévalence globale observée de 30%. Le coefficient de corrélation intra-groupe était de 0.15, et la séroprévalence globale estimée par le modèle bêta-binomial de 19% : intervalle de confiance (IC) à 95% [7 ; 31].

La séroprévalence observée chez les poules du Lac Ichkeul (48%, $n = 65$) était plus élevée que celle observée à Monastir (0%, $n = 10$) : test exact de Fisher, $p = 0.03$.

Le taux de séroprévalence estimé des oiseaux migrateurs à Monastir était de 24%, IC à 95% [12 ; 43]. Il était plus élevé que celui des oiseaux domestiques et péri-domestiques à Monastir : 5%, IC à 95% [1 ; 26] ($p = 0.05$), et moins élevé que celui des oiseaux domestiques au Lac Ichkeul : 48%, IC à 95% [23 ; 74]. Globalement, la séroprévalence au Lac Ichkeul était plus élevée qu'à Monastir ($p = 0.02$).

Espèce	<i>n</i>	Taux de séroprévalence (%)
Aigrette gazette (<i>Egretta garzetta</i>)	4	50
Oie cendrée (<i>Anser anser</i>)	25	40
Gallinule poule d'eau (<i>Gallinula chloropus</i>)	4	25
Avocette élégante (<i>Recurvirostra avosetta</i>)	3	33
Canard colvert (<i>Anas platyrhynchos</i>)	17	6
Goéland marin (<i>Larus marinus</i>)	2	0
Flamant rose (<i>Phoenicopterus roseus</i>)	1	0
Grand cormoran (<i>Phalacrocorax carbo</i>)	2	0

Tableau 10. Taux de séroprévalence des anticorps dirigés contre le virus West Nile observée chez les oiseaux migrateurs en Tunisie

Espèce	<i>n</i>	Taux de séroprévalence (%)
Poule domestique (<i>Gallus gallus domesticus</i>)	75	41
Étourneau sansonnet (<i>Sturnus vulgaris</i>)	11	27
Pigeon biset (<i>Columba livia</i>)	7	0
Perdrix rouge (<i>Alectoris rufa</i>)	1	0
Moineau domestique (<i>Passer domesticus</i>)	12	0

Tableau 11. Taux de séroprévalence observée des anticorps dirigés contre le virus West Nile chez les oiseaux domestiques et péri-domestiques en Tunisie

2.3 Discussion

Le choix des sites d'étude (Bizerte et Monastir) se justifiait par leur climat favorable au développement et à la pullulation des vecteurs de VWN ainsi que la présence d'oiseaux migrateurs. D'autre part ils présentaient des environnements contrastés : naturel à Ichkeul, et très anthropisés à Monastir.

L'avifaune tunisienne est très diversifiée avec près de 300 espèces observées chaque année dont 80 espèces d'oiseaux migrateurs [El hili, 2005]. Il ne serait évidemment pas possible d'obtenir un échantillon de taille suffisante pour toutes ces espèces. Une approche sélective, prenant en compte les caractéristiques de l'avifaune présente en

relation avec l'épidémiologie de la FWN en Tunisie, s'est avérée nécessaire pour définir les espèces faisant l'objet d'investigations. Le moment de l'étude (novembre et décembre) correspondait au passage des oiseaux migrateurs revenant d'Europe [Rappole et al., 2000, Jourdain et al., 2007b].

Le test sérologique ELISA utilisé ici était adapté à cette enquête de séroprévalence car il permettait de détecter les IgG persistant dans le sérum de l'animal plusieurs années après l'infection. Toutefois, cela ne donnait pas d'information sur le moment auquel l'infection avait été contractée, ni sur la présence du VWN dans l'environnement au moment de l'enquête. D'autre part, des réactions croisées peuvent se produire avec d'autres *Flavivirus* du même séro groupe que le VWN, notamment le virus Usutu qui est largement présent en Europe et en Afrique [Nikolay et al., 2011]. Il aurait été nécessaire de contrôler les sérums positifs en ELISA à l'aide d'un test de séroneutralisation, mais cela n'a pu être fait dans cette étude, faute de temps. Les résultats doivent donc être considérés avec prudence car de nombreux oiseaux migrateurs ont pu acquérir une infection par le virus Usutu lors de leurs séjours en Afrique ou en Europe.

La différence notable entre les séroprévalences observées et estimées par le modèle bêta-binomial souligne le danger à traiter les données comme étant des observations indépendantes les unes des autres, les cas positifs étant répartis de manière homogène (conditionnellement aux variables explicatives). La valeur estimée du coefficient de corrélation intra-groupe ($\hat{\rho} = 0.15$) se situait parmi les valeurs élevées observées dans les enquêtes épidémiologiques vétérinaires [Otte et Gumm, 1997], soulignant ainsi l'hétérogénéité de l'exposition au VWN parmi les différentes espèces d'oiseaux étudiées.

La plus forte séroprévalence observée au Lac Ichkeul chez les Poules domestiques par rapport à Monastir est surprenante, car la biodiversité des oiseaux du Lac Ichkeul, très supérieure à celle de Monastir, aurait pu engendrer [El hili, 2005] un effet de dilution. Il serait utile de refaire une enquête sérologique chez ces oiseaux, avec un plan d'échantillonnage plus équilibrés et des effectifs plus importants, au moins à Monastir, pour confirmer cette observation.

Deux Aigrettes garzettes (*Egretta garzetta*) parmi les 4 prélevées présentaient une sérologie positive. Cet oiseau de la famille des Ardeidae (hérons) se rencontre dans les zones humides ouvertes avec de l'eau douce, saumâtre ou salée peu profonde. Il vit sur les berges des fleuves et des lacs, dans les marais, les rizières, les zones inondées, les

plages de sable, les vasières et les mangroves. Il est donc exposé aux moustiques vecteurs du VWN. Il est présent en Europe du sud, sur le pourtour méditerranéen et jusqu'en Afrique subsaharienne. Oiseau généralement migrateur, la majeure partie de la population hiverne en Afrique. Il se reproduit dans les parties tièdes et tempérées d'Europe, Asie, Afrique et Australie. Il migre vers le mois août-septembre. Lors d'une étude menée en Camargue (France), la prévalence observée chez les poussins de hérons était de 1,1 % [0,1-3,8] [Jourdain et al., 2007b]. Le mode de vie de cet oiseau (habitat et alimentation) et la tendance à la sédentarité laisse penser qu'il pourrait jouer un rôle d'amplification et que la séroprévalence observée résulterait d'une infection locale, d'autant que les prélèvements ont été faits en novembre, en fin de période d'activité virale et donc avec un risque cumulé maximal d'exposition au VWN.

Quarante pour cent ($n = 25$) des Oies cendrées (*Anser anser*) ont présenté une sérologie positive pour le VWN. Ces oiseaux vivent autour des marécages et le bord des lacs ce qui les expose aux piqures de moustiques. Les individus de cette espèce sont généralement migrateurs, se déplaçant vers le sud et l'ouest en hiver, vers les Iles Britanniques, l'Espagne, le Portugal, les bords de la Méditerranée ou de la Mer Noire, l'Afrique du Nord ou le Sud de l'Asie selon les populations. Ils migrent vers leurs quartiers d'hiver de septembre à décembre. Leur retour se déroule de fin février à mars. Les taux de prévalence sérologique observés en Europe de l'Ouest et du Nord contre le VWN et autres Flavivirus sont bas chez cette espèce [Jourdain et al., 2011]. Il est donc probable que l'infection contre ces Flavivirus ait été acquise soit en Tunisie, soit en Europe centrale et en Italie. Des informations plus précises sur l'écologie et les migrations des populations d'Oies cendrées présentes en Tunisie seraient nécessaires pour mieux comprendre l'épidémiologie du VWN en Tunisie.

La Gallinule poule d'eau (*Gallinula chloropus*) (taux de prévalence = 25%, $n = 4$) a été identifiée comme une espèce amplificatrice du VWN en Camargue, comme elle a été aussi suspectée d'introduire le virus depuis l'Afrique du nord. Pour l'avocette élégante (*Recurvirostra avosetta*) (taux de séroprévalence de 33%, $n = 3$), fréquente dans les estuaires, les baies, les marais salants et autres zones humides, la migration au départ de l'Europe a lieu entre août et octobre. Entre mars et mai, ces oiseaux retournent vers les aires de reproduction paléarctiques. Cette espèce a été incriminée dans l'introduction du VWN en France depuis l'Afrique sub-saharienne en passant par l'Afrique du nord, car

elle peut jouer un rôle dans l'amplification locale du virus [Jourdain et al., 2007b]. Toutefois, les effectifs très faibles capturés pour ces deux espèces, interdisent de porter des conclusions sur leur rôle épidémiologique.

Un faible taux de séroprévalence a été trouvé chez le Canard colvert (*Anas platyrhynchos*) (6%, $n = 17$). Cette espèce a été trouvée séropositive pour le VWN au Japon [Saito et al., 2009a], et en Corée du Sud [Yeh et al., 2011]. Des chercheurs japonais ont montré que certains canards des espèces de canards pouvaient être responsables de l'introduction du VWN en Asie en raison de leur forte réceptivité à ce virus [Shirafuji et al., 2009]. Des sérologies positives ont également été observées chez les canards sauvages aux États-Unis [Jozan et al., 2003] [Meece et al., 2006]], au Canada [Wojnarowicz et al., 2007], en Russie [Ternovoi et al., 2006], et en Allemagne [Seidowski et al., 2010] et le Japon [Saito et al., 2009b]. Nos observations n'apportent toutefois pas d'arguments forts quant au rôle de cette espèce dans l'épidémiologie du VWN en Tunisie.

L'Etourneau sansonnet (*Sturnus vulgaris*) est un oiseau commun dans les pays tempérés et en Tunisie. En automne, les effectifs tunisiens de cet oiseau augmentent encore avec l'arrivée des migrateurs en provenance du Nord-est de l'Europe. Le taux de séroprévalence observée (27%, $n = 11$) confirme que ces oiseaux peuvent rentrer en contact avec le VWN. En raison de leurs effectifs parfois considérables et de leur comportement grégaire, ils pourraient jouer un rôle dans l'introduction du VWN et son amplification.

Le moineau domestique (*Passer domesticus*) et les autres espèces sauvages péri-domestiques n'ont pas présenté de sérologie positive dans cette enquête mais les effectifs capturés ont été faibles. En France, deux isolats d'une même souche virale, obtenus à partir du cerveau d'une pie bavarde (*Pica pica*) et d'un moineau domestique [Hars et al., 2005a], ont été totalement séquencés. L'analyse phylogénétique du génome complet a révélé que ce virus était proche des souches précédemment isolées en Europe méditerranéenne et en Afrique du Nord. Ces passereaux sédentaires sont fréquemment trouvés à proximité des écuries et pourrait faciliter la transmission aux chevaux du VWN [Jourdain et al., 2007b]. La prévalence élevée observée à Ichkeul (48%, $n = 65$) chez la poule domestique (*Gallus gallus domesticus*) indique que ces oiseaux ont été en contact

avec le virus en été et/ou en automne puisque les poules étaient âgées de 20 à 30 semaines au moment du prélèvement.

2.4 Conclusion

Cette étude a démontré l'exposition des oiseaux domestiques et sauvages au VWN en Tunisie, notamment chez les poules domestiques (*Gallus gallus domesticus*) et les Etourneaux sansonnets (*Sturnus vulgaris*). Les résultats sérologiques souffrent toutefois d'un manque potentiel de spécificité, en raison de l'absence de test de séroneutralisation pour exclure une hypothèse d'infection par un autre *Flavivirus* (Usutu, par exemple). Il ne s'agit donc que d'un travail préliminaire. Cependant, un autre résultat intéressant a été l'identification des Oies cendrées (*Anser anser*) et des Etourneaux sansonnets (*Sturnus vulgaris*) comme des cibles potentielles pour une surveillance de la faune sauvage. Les Oies cendrées seraient intéressantes dans ce cadre, car elles se sont révélées sensibles à l'infection par le VWN à diverses occasions, avec des mortalités susceptibles d'attirer l'attention [Austin et al., 2004].

Chapitre 4. Investigations sur les encéphalites équine d'étiologie non rabique en Tunisie

Introduction

Les cas humains de FWN rapportés ces dernières années, les résultats des enquêtes sérologiques chez les équidés de Tunisie, ceux observés chez les poulets sentinelles, ainsi que ceux obtenus après l'enquête réalisée chez les oiseaux migrateurs, ont tous montré que le virus était présent dans plusieurs régions de Tunisie et transmis aux hôtes vertébrés, sans apparition de manifestations neurologiques chez les équidés.

La question posée est de savoir si des cas cliniques sont survenus chez les équidés de Tunisie sans que des suspicions n'aient été déclarées par le système de surveillance.

Pour y répondre, nous avons utilisé les informations produites par le système national de surveillance de la rage, et notamment les prélèvements de cerveau d'équidés morts ou euthanasiés avec des signes d'encéphalite dont l'origine rabique était suspectée mais infirmée.

La rage est endémique en Tunisie. Un programme national de lutte contre la rage a été entrepris en Tunisie en 1982 (Ben Osman 1985). Il vise à l'éradication de la rage canine, dont le chien constituant le réservoir essentiel et le principal vecteur de la rage humaine et animale (Chadli et al 1982). Depuis, une campagne de vaccination est programmée annuellement et exécutée en deux mois sur tout le territoire du pays. Bien qu'il existe une réglementation spécifique et valable pour la rage et un programme national interministériel impliquant le ministère de la santé publique (prise en charge des personnes agressées), le ministère de l'agriculture (vaccination des chiens et surveillance de la maladie chez les animaux) et le ministère de l'intérieur (abattage des chiens errants), la rage reste enzootique en Tunisie, et mobilise beaucoup de ressources humaines et financières. Il s'agit, comme dans les autres pays maghrébins, de la rage de type urbain.

Chez les chevaux, la rage est une zoonose sporadique mais très souvent mortelle. Les chevaux sont souvent exposés parce qu'ils vivent à proximité des chiens ; ils risquent alors de se faire mordre sur le museau, la face ou le bas de jambes. Chez le cheval, les signes cliniques sont les suivants : comportement agressif, ataxie (manque de coordination), parésie (paralysie partielle), hyperesthésie (hypersensibilité aux stimuli), fièvre, colique, boiterie et position couchée ses signes cliniques rappellent ceux de WN. L'animal malade finit généralement par mourir au bout de quatre ou cinq jours, mais certains individus survivent jusqu'à 15 jours. Le Laboratoire de la Rage de l'Institut

Pasteur de Tunis est le Laboratoire national de référence (LNR) pour le diagnostic de la rage. Cette activité constitue une des composantes essentielles du Programme National de Lutte contre la Rage. Les techniques utilisées sont les techniques de référence, recommandées par l'Organisation Mondiale de la Santé et l'Office International des Epizooties, à savoir l'immunofluorescence directe (IF) et l'isolement viral par inoculation aux cultures cellulaires (neuroblastomes murins N2a.). Tous les prélèvements d'animaux (têtes ou cadavres entiers) sont envoyés au LNR pour diagnostic de rage suite à une suspicion clinique. Toutes les suspicions de rage chez les chevaux établies par les services vétérinaire sont suivies d'envoi d'échantillons appropriés (matière cérébrale pour le diagnostic en post-mortem et LCR et salive pour le diagnostic en ante-mortem). Ces prélèvements subissent en premier lieu le test d'IF. Si le résultat se révèle négatif, ils font l'objet d'une épreuve d'inoculation aux cultures cellulaires de neuroblastomes murins N2a. Si ce test est négatif, la conclusion est que le prélèvement est négatif pour la rage et aucun autre examen n'est entrepris.

1 Matériel et méthodes

Des prélèvements de tissus cérébral d'équidés morts ou euthanasiés, suspectés d'avoir une encéphalite rabique mais trouvés négatifs pour la rage, et qui se trouvaient dans la banque des prélèvements de l'Institut Pasteur de Tunis ont fait l'objet d'investigations complémentaires pour le VWN.

Une liste de prélèvements a été établie depuis 2002 (Tableau 12) de laquelle seuls 15 prélèvements ont pu être exploités. En effet, faute de moyens de stockage, les prélèvements négatifs pour la rage sont conservés uniquement pendant trois ans, puis ils sont détruits. Les prélèvements positifs sont détruits après diagnostic. Les chevaux correspondant aux prélèvements exploitables provenaient de plusieurs gouvernorats du nord (Bizerte, Beja, Kef), du centre (Kasserine, Kairouan, Sidi Bouzid, Mahdia) et du sud (Gabes, Gafsa) (Tableau 13).

Année	Prélèvements reçus	Prélèvements négatif
2002	13	5
2005	19	15
2006	14	3
2007	10	2
2008	30	7
2009	23	7
2010	29	5
2011	13	0
Total	151	44

Tableau 12 : Prélèvements de cerveaux d'équidés reçus au laboratoire de la rage à l'Institut Pasteur de Tunis

Région	Nombre de prélèvement
Siliana	1
Kef	1
Beja	1
Bizerte	2
Kairouan	2
Mahdia	2
Sidi Bouzid	2
Gabes	1
Gafsa	1
Kasserine	2
Total	15

Tableau 13. Nombre de prélèvements d'encéphalite équine par région

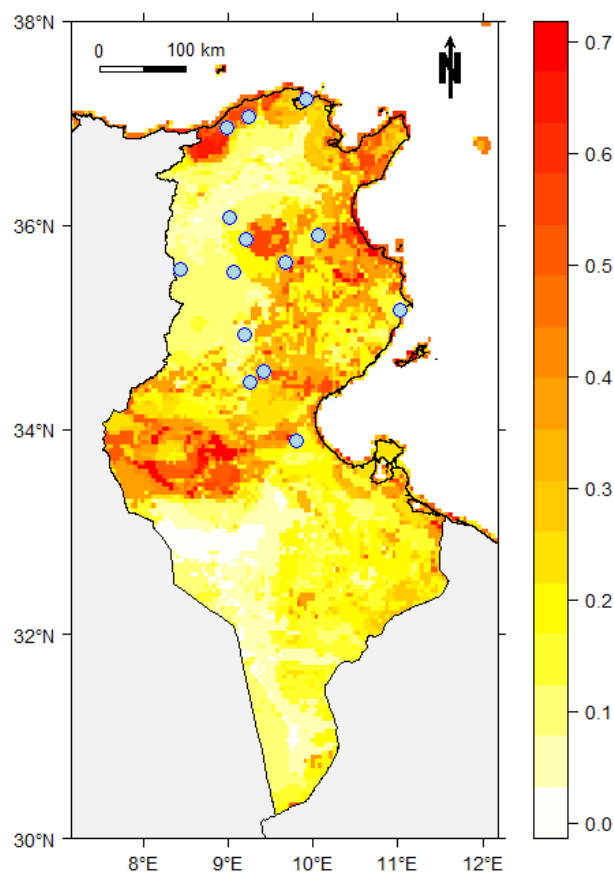


Figure 33 Localisation des prélèvements analysés pour West Nile en Tunisie (points bleus). Le fond de carte est la probabilité de prévalence sérologique chez les chevaux prédite par inférence multi-modèle en fonction de variables environnementales. L'échelle colorée à la droite du graphe donne la valeur des probabilités correspondant à la couleur.

Une recherche directe du VWN a été réalisée sur les prélèvements de cerveaux. La procédure d'extraction des ARN est présentée en annexe 1. L'extraction d'ARN a été réalisée sur des échantillons de cerveaux sur des colonnes de silice en utilisant un kit commercial, selon les indications du fournisseur (RNeasy mini Kit, QIAGEN). L'ARN extrait a ensuite été conservé à -80 °C.

Les ARN extraits étaient dans un premier temps testés par RT-PCR pour recherche du génome viral pour WN ou autre *Flavivirus* du séro groupe de l'encéphalite japonaise. Un isolement était prévu à partir des échantillons positifs. Les techniques utilisées sont des tests classiques de virologie : la réaction en chaîne par polymérase en temps réel (RT-PCR en temps réel) et niché et la RT-PCR conventionnelle. La RT-PCR en temps réel est décrite en annexe 2, et la RT-PCR conventionnelle est présentée en annexe 3. La réaction

de polymérisation en chaîne (PCR) est une technique extrêmement sensible qui permet d'amplifier spécifiquement un fragment d'ADN. Le VWN étant un virus à ARN, son génome doit être d'abord transcrit en ADN à l'aide d'une transcriptase inverse avant d'être amplifié par PCR. L'amplification a été réalisée en utilisant des amorces spécifiques de la région 5'NC et C du génome du VWN [Linke et al., 2007]:

WNproC-F 10 (5'-CCTGTGTGAGCTGACAACTTAGT-3')

WNproC-R 153 (5'-GCGTTTTAGCATATTGACAGCC-3')

Pour contrôler la qualité des échantillons et de l'étape d'extraction des ARN, une amplification du gène de la beta-actine (ARN cellulaires) a été réalisée en parallèle de la PCR du VWN (protocole multiplex), à l'aide des amorces suivantes:

ACTBfrw966 (5'-CAGCACAATGAAGATCAAGATCATC-3')

ACTBrev1096 (5'-CGGACTCATCGTACTCCTGCTT-3')

Les sondes utilisées sont des sondes TaqMan classiques FAM-TAMRA (pour le VWN) ou VIC-TAMRA (pour la beta-actine) :

WNproC-probe (5'-FAM-CCTGGTTTCTTAGACATCGAGATCT -TAMRA-3')

ACTB1042-67 (5'-VIC-TCGCTGTCCACCTTCCAGCAGATGT-TAMRA-3')

Des dilutions en série d'un témoin positif et quantifié (suspension de WNV IS98 [Lucas et al., 2004] avec pour titre initial : 10^6 pfu/ μ L ; dilutions en série d'un facteur 10) ont été préparées afin de tracer une courbe standard et mesurer l'efficacité de la PCR. Dans un tube réactionnel, la synthèse de l'ADN complémentaire et la PCR ont été réalisées dans un volume total de 25 μ L en une seule étape en utilisant le kit AgPath-ID™ One-Step RT-PCR (Applied Biosystems).

Réactifs	Volume par tube (μL)
H2O DEPC	5.1
Tampon (Concentration 2X)	12.5
RT-PCRMix(Concentration 25X)	1.0
Amorce ProC F 100 μM	0.1
Amorce ProC R 100 μM	0.1
Sonde ProC 10 μM	0.5
Amorce β-actine F 100 μM	0.1
Amorce β-actine R 100 μM	0.1
Sonde β-actine 10 μM	0.5
ARN	5.0

Tableau 14. Volumes de réactifs de PCR utilisés par tube

Les tubes réactionnels (Tableau 14) ont été incubés dans un thermocycleur en suivant le programme suivant :

- réverse transcription à 45°C pendant 10 min
- dénaturation à 95°C pendant 10 min
- 40 cycles de 15 secondes à 95°C et de 1min à 60°C ; la fluorescence est mesurée à l'issue de l'étape d'incubation à 60°C.

Comme pour la RT-PCR en temps réel, la RT-PCR conventionnelle commence par une première étape de transcription inverse, suivie de la PCR proprement dite puis de la détection du fragment d'ADN amplifié par PCR de taille appropriée par migration sur un gel d'électrophorèse. Une partie du gène codant la protéine NS5 de différents *Flavivirus* sont amplifiées par ce protocole qui permet de détecter tous les virus du séro groupe de l'encéphalite japonaise.

Pour la transcription inverse, des hexamères aléatoires (*random primers*) servent d'amorce. La transcription inverse est faite en utilisant le kit SuperScript III (SSIII, InVitrogen) avec l'enzyme SSIII, son tampon, du DTT (dithiothréitol), des dNTP

(déoxyribo-nucléotides-tri-phosphates) et de l'eau ultra pure de qualité biologie moléculaire. Dans chaque tube, on a déposé :

- ARN 2 μ L
- Héxamères aléatoires (0,15 μ g / μ L) 2 μ L
- dNTP 10mM 1 μ L
- H₂O RNase free 9 μ L

Les tubes ont été incubés pendant 5 min à 65°C puis placés sur de la glace. On a ensuite ajouté les solutions suivantes dans chaque tube :

- Tampon 5X 4 μ L
- 0.1M DTT 1 μ L
- RT SSIII (InVitrogen) 1 μ L

Ensuite les tube ont été incubés à 25°C pendant 10 min, à 50°C pendant 1 h et à 70°C pendant 15 min.

La PCR a été réalisée avec les amorces suivantes :

- WNV9040 (5'-TACAACATGATGGGVAARAGAGAGA-3')
- WNV10124 (5'-AGCATGTCTTCYGTBGTCCATCCAYT-3')

Dans chaque tube de PCR, on a déposé 48 μ L de mélange composé de :

- - MasterMix 2X ("HotStartTaq Master Mix Kit" Qiagen) 25 μ L
- - WNV9040 (10 μ M) 4 μ L
- - WNV10124 (10 μ M) 4 μ L
- - H₂O 15 μ L

Puis on a ajouté 2 μ L des ADNc (obtenus à l'issue de l'étape de transcription inverse).

Les tubes réactionnels ont été incubés dans un thermocycleur selon le programme suivant :

- dénaturation à 95°C pendant 15min
- 45 cycles de 30 secondes à 94°C, 30 secondes à 60°C et 60 secondes à 72°C
- étape d'élongation à 72°C pendant 10min.

Le produit PCR de 1084 pb est visualisé par électrophorèse : dépôt de 10 μ L du produit de la réaction de PCR avec 2 μ L de bleu de charge et un dépôt de 4 μ L de poids

moléculaire (100bp DNA ladder, Biolabs) sur un gel d'agarose à 1%, après 30 min de migration à 90 V.

2 Résultats

Tous les prélèvements d'encéphales analysés ont été trouvés négatifs par la RT-PCR conventionnelle (Figure 34) et par la RT-PCR en temps réel et nichée. Les encéphalites équine ayant fait l'objet des investigations mentionnées ci-dessus n'étaient donc pas dues à une infection par le virus rabique (cas écartés par des analyses antérieures), le VWN, ni un Flavivirus autre que le VWN.

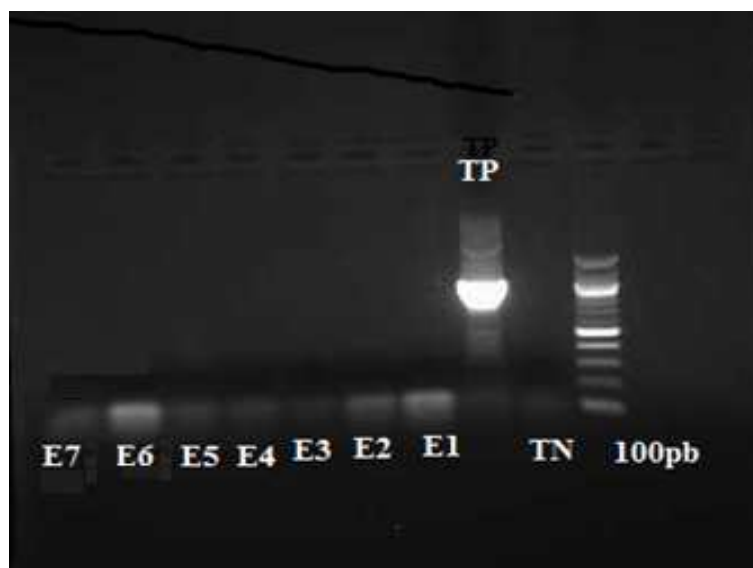


Figure 34. Les produits de RT-PCR issus des échantillons prélevés sur des chevaux atteints d'encéphalite ont été analysés par électrophorèse sur un gel d'agarose. Un marqueur d'ADN de 100 bp a été utilisé. TN : témoin négatif, TP : témoin positif E1-E7 : échantillons de 1 à 7.

3 Discussion

Les prélèvements étudiés en Tunisie ne représentaient pas la totalité des chevaux morts d'encéphalite car notre échantillonnage s'est limité aux prélèvements disponibles dans le Laboratoire de la Rage de l'Institut Pasteur de Tunis, sur la période allant de 2009 à 2012. Peu de prélèvements provenaient de régions à risque élevé d'infection par le VWN (Figure 33). Il est donc difficile de dire si l'absence de cas de FWN identifiés chez les équidés de Tunisie morts d'encéphalite pendant cette période était liée à un

problème de sensibilité du réseau de surveillance passive qui est basé sur le diagnostic clinique d'infections à VWN chez les chevaux pendant la période à risque (de septembre à novembre) et surtout en zone à risque élevé.

Cependant, les symptômes cliniques du VWN chez les chevaux ne sont pas spécifiques. La rage étant endémique en Tunisie, des symptômes d'encéphalite observés chez les équidés conduisent à juste titre les vétérinaires à suspecter la rage en premier lieu. Ces dernières années, le nombre de cas cliniques et le taux de mortalité causés par le VWN chez les chevaux dans les pays méditerranéens a augmenté de façon significative [Calistri et al., 2010]. Il serait pertinent de mieux former les vétérinaires aux causes d'encéphalites équine, et de mettre en place une procédure de diagnostic aboutissant à rechercher le VWN (et autres agents pathogènes susceptibles de causer des encéphalites chez les équidés). Dans ce contexte la suspicion d'encéphalite West Nile s'impose dès que des signes cliniques sont observés et que le contexte épidémiologique ne permet pas d'exclure cette affection. On doit rappeler que des troubles nerveux peuvent être causés par autres le virus qui sont déjà présent comme de la rhinopneumonie [Ghram et al., 1997] qui circule largement dans toutes les populations d'équidés en Tunisie. Toutefois, dans les formes nerveuses de rhinopneumonie, les signes cliniques sont ceux d'une faiblesse de l'arrière train puis d'une paralysie progressive ascendante. Bien que les signes cliniques soient variables, les encéphalites à VWN sont plus facilement suspectées lorsqu'un animal montre des signes d'atteinte cérébrale diffuse à condition que le vétérinaire fasse la bonne orientation du diagnostic clinique

La méthode de RT-PCR en temps réel utilisé pour rechercher le VWN sur cerveaux de chevaux est très sensible : seuil de détection inférieur à 10^{-2} pfu/mL. Ce protocole présente aussi l'avantage de détecter une partie du gène codant pour la protéine NS5 [Weissenböck et al., 2002] des *Flavivirus* autres que le VWN. Un séquençage des produits PCR obtenus par la RT-PCR conventionnelle permet de déterminer ensuite la nature du *Flavivirus* identité. En effet, la détection de l'acide nucléique par la technique de la transcription inverse couplée à une réaction d'amplification en chaîne par polymérase (RT-PCR) augmente de manière significative l'identification des tissus infectés par le VWN, plus particulièrement quand une RT-PCR est réalisée sur des échantillons équine, frais et non fixés, de cerveau et de moelle épinière [Johnson et al., 2001]. L'isolement sur culture cellulaire du VWN à partir de tissu nerveux équin peut être difficile, en effet, le virus ne se réplique pas à titre élevé dans le cerveau des équidés [Johnson et al., 2001].

Par contre le VWN a été isolé sur des cellule Véro à partir d'échantillons de bulbe rachidien, cervelet, cortex cérébral et moelle épinière d'un cheval mort en France en 2000 [Murgue et al., 2001b] puis détecté par RT-PCR et séquencé. Cette séquence d'événements est exceptionnelle avec le VWN.

En conclusion de cette partie, la recherche du VWN sur les prélèvements de cerveaux d'équidés négatifs pour le virus rabique a été infructueuse, ce qui est malheureusement fréquent y compris chez les chevaux effectivement morts de FWN. Ce résultat n'exclut cependant pas la possibilité d'avoir des cas cliniques chez les équidés lors d'épizooties de FWN en Tunisie. En conséquence de l'introduction de virus Usutu en Europe centrale, les programmes de surveillance des *Flavivirus* (basé sur la détection du virus chez les moustiques et des oiseaux et chevaux morts ainsi que des enquêtes épidémiologiques) devraient être établies en Tunisie, comme celles initiées aux États-Unis États-après la première apparition du VWN [Bernard et al., 2001, Eidson et al., 2001].

Un effet positif de cette étude a été la mise en place d'une procédure diagnostique au niveau du laboratoire, en collaboration avec l'Institut Pasteur de Tunis, pour chercher le VWN dans les prélèvements de chevaux atteints d'encéphalite non rabique. Cette procédure devrait être formalisée dans le système de surveillance de la FWN qui pourrait être instauré.

Chapitre 5. Discussion générale : le contrôle de la fièvre West Nile en Tunisie

Introduction

Dans les pays où le VWN est endémique, de nouvelles souches plus virulentes pourraient être introduites et provoquer des cas graves chez les équidés, à l'image de l'épizootie au Maroc en 2003 avec la lignée 1 [Schuffenecker et al., 2005] ou en Afrique du Sud avec la lignée 2 [Venter et al., 2009]. Par conséquent, il est nécessaire de concevoir et mettre en œuvre un système complet de surveillance de la FWN en Tunisie, sur le long terme.

1 Réseau national de surveillance de la fièvre West Nile

En Tunisie, il a été décidé d'élaborer et de mettre en place d'un réseau d'épidémiosurveillance de la FWN. Le réseau implique de nombreux acteurs de la santé animale et de la santé publique (Figure 35): Direction Générale des Services Vétérinaires (DGSV), Centre National de Veille Zoosanitaire (CNVZ), Institut de Recherche Vétérinaire (IRVT), Ecole National de Médecine Vétérinaire (ENMV), Institut Pasteur de Tunis (IPT), Fondation Nationale d'Amélioration de la Race Chevaline (FNARC), Observatoire National des Maladies Nouvelles et Emergentes (Ministère de la Santé Publique), les Commissariats Régionaux au Développement Agricole (CRDA) des gouvernorats à risque, les vétérinaires de libres pratiques.

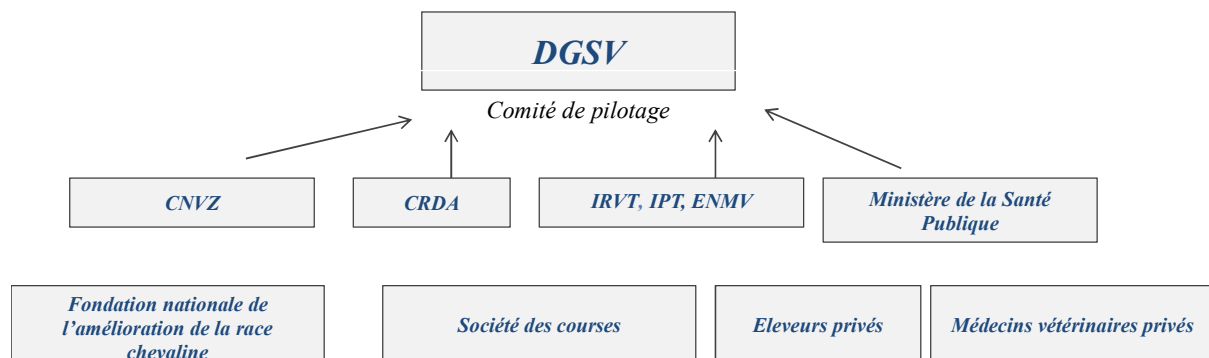


Figure 35. Organisation et partenaires du réseau de surveillance de la fièvre West Nile en Tunisie

La méthodologie de surveillance retenue en Tunisie repose sur 4 volets :

- **Humain** : surveillance des cas humains d'encéphalites dans les établissements hospitaliers des zones à risque de circulation du VWN.

- **Equin** : la surveillance des cas cliniques d'encéphalite équine, repose sur la déclaration obligatoire, sur l'ensemble du territoire, de toute suspicion d'encéphalite par les vétérinaires sanitaires auprès de la direction générale des services vétérinaires. Ce volet équin est intégré dans le réseau national d'épidémiosurveillance de la rage qui recense les déclarations de syndromes nerveux des équidés. Malheureusement, dans le cadre de ce réseau, la recherche systématique du VWN n'est pas effectuée sur les syndromes nerveux détectés. Le volet équin repose avant tout sur la vigilance des vétérinaires praticiens et la rapidité des laboratoires à établir un diagnostic de certitude. Jusqu'à présent, les vétérinaires ne pensent pas à la FWN devant un tableau clinique d'encéphalite ou de méningo-encéphalite chez les équidés, et aucun cas clinique n'a été rapporté en Tunisie, contrairement à ce qui est observé au Maroc ou en Israël.
- **Aviaire** : la surveillance passive de la circulation du VWN dans l'avifaune est basée sur un suivi des surmortalités aviaires et ciblée dans les zones et sur les périodes à risque. Elle consiste à rechercher le VWN sur les encéphales des cadavres d'oiseaux sauvages collectés lors des épisodes. La surveillance aviaire s'intègre dans le réseau de veille et de surveillance de l'influenza aviaire. Elle n'a donné aucun résultat concernant l'identification du VWN jusqu'à présent. Cela est à rapprocher du caractère apparemment asymptomatique de l'infection par la VWN chez l'avifaune sauvage et domestique, à l'exception de la mortalité aviaire rapportée en 1997 pendant l'épidémie humaine de FWN, mais qui n'avait pas donné lieu à un diagnostic.
- **Volet entomologique** : la surveillance entomologique, consiste jusqu'à présent en un inventaire des espèces de moustiques et une recherche du VWN chez des moustiques capturés autour des foyers équins et ou humains. Aucune surveillance n'est réalisée sur le long terme dans les zones connues comme étant à haut risque d'occurrence de FWN.

Au bilan, le système actuel de surveillance de la FWN en Tunisie est peu fonctionnel et il faut attendre la survenue de cas graves humains pour que la survenue d'un cycle épidémique soit révélée. Ce système ne peut en aucun cas servir d'alerte précoce : les seules mesures applicables sont l'information des populations humaines exposées, la promotion de mesures de protection individuelles contre les piqûres de moustiques chez l'homme, et la vaccination des chevaux. La démoustication reposant sur des traitements adulticides a une efficacité faible, voire nulle.

On peut penser qu'un système de surveillance et de vigilance tourné vers l'alerte précoce, c'est-à-dire conçu pour repérer les conditions favorables à l'amplification du cycle viral, ou le tout début de son occurrence, aurait une meilleure efficacité en terme de santé publique.

2 Comment améliorer la surveillance de la fièvre West Nile en Tunisie ?

2.1 Objectifs

La surveillance de la FWN en Tunisie aurait plusieurs objectifs. Le premier, et le plus important en termes de santé publique, serait le déclenchement d'une alerte suffisamment précoce pour que des mesures efficaces de protection de la santé publiques puissent être prises.

Ensuite, le système de surveillance devrait permettre l'isolement et la caractérisation fine des souches virales circulant, de manière à identifier l'introduction sur le territoire de nouvelles souches virales, éventuellement plus pathogènes que celles circulant auparavant.

Enfin, les résultats de la surveillance devraient être partagés au niveau national entre la santé animale et la santé humaine, ainsi qu'aux niveaux régional et international. Cet objectif serait important au moment où le Centre National de Veille Zoo-sanitaire (CNVZ) ambitionne une reconnaissance régionale labellisée par l'Organisation mondiale de la santé animale (OIE).

Le réseaux de surveillance épidémiologique pourrait reposer sur la sensibilité du maillage vétérinaire existant (surveillance passive) ou sur la mise en place de systèmes d'alerte spécifiques visant à mettre en évidence la présence du virus (surveillance active) dans le but de diffuser des messages de prévention à l'attention des populations humaines et des propriétaires des populations animales à risque [Dufour et al., 2006].

La mise en évidence de cas humains de FWN en 1997, 2003, 2010, 2011 et 2012 dans plusieurs gouvernorats de Tunisie a révélé la nécessité de disposer d'un système de surveillance de la FWN afin d'alerter le plus précocement possible les autorités sanitaires compétentes. Compte tenu des caractéristiques de l'infection chez les équidés et les oiseaux domestiques, ces espèces sont des cibles intéressantes pour la mise en place d'un tel système.

2.2 Méthodes et outils

2.2.1 Alerte environnementale

La dynamique de population des moustiques vecteurs du VWN est très dépendante de l'environnement et particulièrement du climat [Randolph et Rogers, 2010]. Un hiver doux, suivi d'un printemps et d'un été secs, avec des vagues de chaleur en juillet, et d'un automne orageux avec de fortes précipitations, pourraient favoriser l'émergence de maladies vectorielles. La sécheresse favorise les contacts entre les oiseaux hôtes et les moustiques vecteurs, en particulier autour des points d'eau, facilitant l'amplification des arbovirus dans ces populations [Epstein, 1999]. En Tunisie, la présence de zones humides et des sites Ramsar peut déclencher l'amplification du VWN et son « débordement » vers les hôtes équin ou humains en cas d'événement climatique exceptionnel, par exemple de fortes précipitations ou /et inondation.

D'une manière générale, l'agressivité des moustiques est positivement corrélée à la température, au taux d'humidité couplé à la pluviométrie et à l'ensoleillement [Ludwig et al., 2005]. L'été-automne 1997 a été marqué par une pluviométrie anormalement élevée en Tunisie et une pullulation de moustiques particulièrement abondante ce qui aurait permis la transmission à l'homme. Nous avons également observé, lors de notre enquête sérologique sur les équidés, que la température et l'humidité (approchée par l'indicateur de végétation NDVI) étaient associées à des taux élevés de prévalence sérologique du VWN.

Des facteurs climatiques analogues ont été également suggérés comme facteurs de déclenchement des épidémies de FWN en Algérie et au Maroc [Triki et al., 2001], précédées, elles aussi, par une pluviométrie anormalement élevée et survenues aux mêmes périodes de l'année. Dans le sud de la France, les années 1999 et 2000 étaient caractérisées par une agressivité de *Culex modestus* deux à trois fois supérieure à la moyenne, survenant deux semaines avant la fin de l'été, moment d'apparition des premiers cas chez le cheval [Ludwig et al., 2005].

En Tunisie, les zones à haute risque de transmission du VWN ont été identifiées sur l'ensemble du territoire national suite à notre travail. Une carte de prédiction de ce risque a été proposée pour la Tunisie. Même si elle ne constitue pas une carte du risque de transmission à l'Homme, elle peut fournir des indications intéressantes pour les

gestionnaires de la santé publique en déclenchant une alerte précoce dans les régions à haut risque prédit, et qui seraient le siège d'événements climatiques favorables à l'éco-épidémiologie du VWN. On peut observer qu'en début d'automne des années 2010, 2011 et 2012, des cas humains de FWN ont été diagnostiqués dans les régions du Nord-Ouest, des Chott, et du Sahel, toutes trois classées à haut risque sur cette carte.

Les informations disponibles sur la localisation des cas humains pourraient être exploitées de manière similaire aux données de l'enquête sérologique sur les équidés, en permettant une recherche des conditions environnementales liées à l'occurrence de cas clinique. Nous ambitionnons de faire ce travail dans un avenir proche, comme cela a été fait récemment pour la fièvre de Lassa en Afrique de l'Ouest.[Fichet-Calvet et Rogers, 2009]

2.2.2 Surveillance ciblée dans les zones à haut risque de transmission

Des valeurs élevées de prévalence sérologique, et par conséquent de transmission du VWN chez les équidés, ont été identifiées (i) dans le nord : Jendouba, Béja, Bizerte, (ii) dans les régions côtières de Sousse et de Monastir, (iii) dans la frontière de la Siliana et Kairouan, (iv) et dans la zone de Chott (Tozeur, Kébili). Ces zones à risque devraient faire l'objet d'une surveillance basée sur des enquêtes entomologiques avec recherche virale, dont les objectifs seraient (i) d'identifier les espèces de moustiques responsables de la transmission du virus aux oiseaux, aux équidés et aux hommes, (ii) d'évaluer la dynamique de population de ces vecteurs potentiels au cours de l'année, et (iii) d'isoler le virus dans le but d'approfondir les connaissances de l'épidémiologie du VWN en Tunisie.

Au cours de cette thèse, nous avons initié des recherches entomologiques pour fournir la base d'une surveillance entomologique fondée sur le risque de FWN. Cette étude entomologique s'est déroulée en même temps et dans les mêmes sites que le suivi des poulaillers sentinelles. Des captures de moustiques ont été réalisées dans les 5 sites de suivi de poules sentinelles en utilisant des pièges CDC lumineux appâtés au CO₂. A l'issue des captures, les moustiques ont été ramenés au laboratoire, tués à -20°C, triés puis identifiés. En parallèle une étude sur la préférence trophique des moustiques capturés a été effectuée, en réalisant une analyse des repas sanguin par PCR. Les résultats de ces études sont en cours d'analyse. Les résultats préliminaires ont montré l'abondance des

espèces *Culex pipiens* et *Ochlerotatus caspius* qui ont identifiés comme vecteurs potentiels durant l'épizootie de 1998 en Italie. [Romi et al., 2004]. Le Tableau 15 présente les vecteurs potentiels du virus West Nile qui sont présents sur le littoral méditerranéen

Moustique	Contact naturel virus/moustique	Infection expérimentale	Transmission expérimentale	Origine de l'observation
<i>Aedes vexans</i>	X	X		Russie, Sénégal, USA
<i>Aedes albopictus</i>	X	X		USA, Mexique, France
<i>Anopheles maculipennis s.l.</i>	X			Portugal, Ukraine, Russie, Biélorussie
<i>Anopheles plumbeus</i>			X	France*
<i>Anopheles hyrcanus</i>	X			Russie
<i>Coquilletidia richiardii</i>	X			Bulgarie, Russie, Roumanie
<i>Culex modestus</i>	X	X	X	France~*, Russie
<i>Culex pipiens</i>	X	X	X	Afrique du Sud, Bulgarie, Egypte, Israël, Roumanie, République Tchèque, USA, Portugal, Italie, France~
<i>Culex theileri</i>	X			Afrique du Sud
<i>Culiseta morsitans</i>	X			USA
<i>Culiseta longiareolata</i>			X	
<i>Ochlerotatus cantans</i>	X			Bulgarie, Slovaquie, Ukraine
<i>Ochlerotatus caspius</i>	X	X	X	Ukraine, Italie, Israël, France~
<i>Ochlerotatus dorsalis</i>	X	X		USA
<i>Ochlerotatus geniculatus</i>			X	France*
<i>Ochlerotatus punctor</i>			X	France*
<i>Ochlerotatus sticticus</i>	X			USA
*Vermeil et al. 1960	*Hannoun et al. 1964	~Balenghien et al. 2008		

Tableau 15. Vecteurs potentiels du virus West Nile sur le littoral méditerranéen français
[Balenghien et al., 2006, Hannoun et al., 1964, Vermeil et al., 1960]

La recherche entomologique doit être effectuée en constante interaction avec les autres volets de surveillance. En particulier, il serait pertinent de réaliser une grande enquête nationale sur la faune culicidienne de manière à identifier la distribution et la dynamique saisonnière des principales espèces de moustiques. La récurrence des foyers de FWN, le risque d'introduction de la fièvre de la Vallée du Rift et d'autres arboviroses, le risque d'introduction de nouvelles espèces de moustiques invasives telles qu'*Aedes albopictus* sont autant d'arguments pour réaliser une enquête de grande ampleur. De tels travaux ont par exemple été entrepris en Belgique (projet MODIRISK) et ont permis l'identification d'espèces invasives qui auraient pu rester inaperçues pendant plusieurs années, et modifier le risque de transmission d'arbovirus sans que cela n'ait été su [Versteirt et al., 2009].

La surveillance entomologique pourrait constituer un pilier en termes d'alerte précoce uniquement si tous les moyens nécessaires pouvaient être mis en œuvre. Ce travail mobilise en effet du personnel et des moyens techniques et financiers pour un résultat parfois peu concluant [Perra et al., 2002]. Le mode de fonctionnement des pièges utilisés

est apparu également comme un facteur limitant (commande et livraison de la carboglace, piles rechargeables) de même que le respect de la chaîne du froid pour la préservation du virus éventuellement présent. Il faudrait un changement radical des conditions actuelles (budget quasi inexistant, manque de personnel qualifié) pour réellement envisager une surveillance entomologique ambitieuse avec un rôle d'alerte précoce en Tunisie.

Outre la détermination du vecteur, l'isolement ou la caractérisation de souches de VWN à partir de pools de moustiques reste une priorité. En effet, l'analyse génétique du virus permettrait peut-être d'expliquer l'absence de cas cliniques chez les équidés infectés et de tester l'hypothèse de la circulation d'une souche atténuée comme cela a été envisagé au Texas et à Mexico [Davis et al., 2004]. Cependant, la probabilité de capturer un moustique infecté par échantillonnage en un lieu et à un moment donné est faible : de l'ordre de 1 à 3 pour 1000 dans des zones à forte circulation virale. Dans ce contexte, les moustiques constituent un indicateur médiocre de la circulation virale en termes de probabilité de détection. Considérant le faible rapport bénéfice/coût qui résulte de cette surveillance spécifique, elle ne serait pas conduite de façon systématique mais uniquement activée en cas de mise en évidence d'une forte circulation virale (séroconversion chez des oiseaux sentinelles, cas cliniques chez l'homme).

Cette identification virale pourrait aussi être obtenue par l'enquête sur oiseaux domestiques sentinelles. Ce type de surveillance entre dans le cadre de la surveillance active. Elle repose sur la surveillance sérologique de l'avifaune en détectant les conversions sérologiques sur des populations sentinelles (volailles dans plusieurs sites). Le suivi des oiseaux sentinelles est largement utilisé pour détecter la transmission du VWN, même à bas bruit. Dans le bassin méditerranéen, les enquêtes virologiques et sérologiques chez le poulet sentinelle ont donné de bons résultats en Egypte [Soliman et al., 2010] et en Grèce [Chaskopoulou et al., 2011]. Notre enquête sérologique chez les équidés a montré qu'il y a eu une transmission du virus en octobre 2011 dans les régions de Monastir et Jendouba, et septembre 2012 dans la région de Monastir préalablement identifiées comme des régions à haut risque de transmission du VWN.

Ce système de surveillance d'oiseaux sentinelles pourrait être mis en œuvre en Tunisie, dans les zones à haut risque identifiées par notre étude : Jendouba, Bizerte, Nabeul, Sousse, Monastir, Sfax, Médenine, Kebili et Djerba. Vus la lourdeur de système et les

coûts élevé pour l'entretien et les déplacements, je propose de maintenir au minimum le système de poulaillers sentinelles dans deux gouvernorats à risque très élevé, Monastir et Jendouba, dans lesquels 5 sites seraient choisis par gouvernorat. Les poules seraient placées dans des cages (10 oiseaux par cage) dans des zones où les moustiques seraient abondants. On prélèverait du sang et un écouvillon cloacal sur les poules une fois par semaine, pour recherche d'anticorps et RT-PCR. Ce schéma de surveillance a permis de détecter précocement la circulation virale et est efficace même en l'absence de symptomatologie associée. En Grèce et en Egypte, il a permis de détecter la présence du VWN, voire de l'isoler [Soliman et al., 2010, Chaskopoulou et al., 2011]. Le système devrait fonctionner de début mai jusqu'à décembre.

En complément, les chiens domestiques, qui sont réceptifs au VWN, pourraient être utilisés comme espèce sentinelle pour la surveillance de ce virus [Resnick et al., 2008b]. En effet, les chiens et les humains partagent le même environnement et l'incidence de l'infection chez les chiens pourrait être un meilleur facteur prédictif du risque chez l'être humain que l'incidence chez les poulets sentinelles ou les équidés [Resnick et al., 2008c]. En outre, les repas de sang analysés chez les moustiques du genre *Culex* à Houston prouvent qu'ils peuvent piquer les chiens pour prendre un repas sanguin [Molaei et al., 2007]. L'utilisation des chiens comme sentinelles est alors apparue comme un système sensible et précoce puisque la séroconversion a été observée 6 semaines avant l'apparition du premier cas humain à Houston [Resnick et al., 2008c]. En Tunisie, cette surveillance pourrait par exemple être effectuée sur les effectifs de chiens de l'armée à Bizerte et dans le grand Tunis, et de la brigade canine de la douane tunisienne dans les régions des Chott et du Sahel.

Un suivi sérologique d'une cohorte d'équidés sentinelles peut également être envisagé, par exemple sur les chevaux des haras de la Fondation nationale d'amélioration de la race chevaline (FNARC) situés dans le grand Tunis, à Monastir et dans les haras de l'armée tunisienne. Cette méthode a été utilisée en Italie en 2009 : durant le printemps 2009, 28 chevaux non vaccinés et présentant un statut sérologique négatif pour le VWN ont été placés dans chacune des 5 provinces retenues pour l'étude. L'effectif avait été choisi pour pouvoir détecter une incidence supérieure à 10% (IC à 95%). Des séroconversions chez ces chevaux sentinelles ont été détectés dans trois provinces au début du mois d'août [Angelini et al., 2010].

Pour calculer la taille de l'échantillon d'animaux sentinelles à installer dans une région donnée, on suppose que le risque de transmission est uniforme dans cette région, ainsi que la distribution spatiale des animaux susceptibles d'être choisis comme sentinelles. Ces hypothèses permettent de ramener le calcul de la taille de l'échantillon à celui de la détection de la présence d'une maladie dans une population de taille finie. La taille est obtenue par l'équation [Martin et Willeberg, 1987] $n = \left(1 - \alpha^{1/Np}\right) \left(N - \frac{Np-1}{2}\right)$, avec :

- n la taille de l'échantillon ;
- N la taille de la population : nombre d'animaux vivant dans la zone et susceptibles d'être choisis comme sentinelles ;
- α le risque de première espèce (par exemple 5%) ;
- p le taux d'incidence sérologique que le dispositif doit permettre de détecter (avec une probabilité de $(1-\alpha)$).

2.2.3 Surveillance syndromique

Le système général de surveillance passive (ou événementielle) des maladies animales repose sur le rapport de suspicions cliniques par les éleveurs et vétérinaires. Nous avons vu qu'en Tunisie, dans le cas de la FWN, ces suspicions cliniques passent inaperçues ou surviennent rarement chez les équidés ce qui limite l'intérêt de cette surveillance événementielle. Il convient toutefois de vérifier qu'il ne s'agit pas d'une sous-déclaration des suspicions par les acteurs du réseau de surveillance. De plus, de nouvelles souches virales plus pathogènes sont susceptibles d'apparaître. Les premières investigations que nous avons faites sur les encéphalites équine non rabiques méritent donc d'être poursuivies, en sensibilisant les éleveurs et vétérinaires situés dans des zones à haut risque, et en renforçant cette surveillance événementielle pendant les périodes de proliférations de moustiques et d'abondance des oiseaux sauvages : fin d'été et automne.

Au-delà des équidés, la surveillance passive repose également sur la surveillance de la mortalité chez les oiseaux sauvages. La mortalité massive des corbeaux enregistrée pendant l'épidémie de FWN en 1997 en Tunisie [Feki et al., 2005] pourrait être liée à l'infection par le VWN. Cependant aucune enquête chez des oiseaux morts n'a permis de corroborer cette hypothèse. Toutefois, le VWN isolé en Tunisie en 1997 était similaire à la souche isolée en 1998 en Israël, ainsi qu'à la souche isolée à New York en 1999. Ces

souches ont causé des mortalités dans l'avifaune sauvage américaine, en particulier chez les corvidés [Lanciotti et al., 1999]. Il serait ainsi important de mettre en place une surveillance des mortalités de l'avifaune sauvage afin de détecter l'introduction de souches virales hautement pathogènes avant qu'elles n'infectent les chevaux et les humains. Les mortalités d'oiseaux sauvages font d'ailleurs l'objet depuis 2005 d'une surveillance sur l'ensemble du territoire tunisien pour la détection du virus de l'influenza aviaire. Cette surveillance est assurée par le réseau de la Direction générale des services vétérinaires, et les laboratoires agréés (IRVT et Institut Pasteur de Tunis). Dans tous les gouvernorats à risque de FWN, sur chaque oiseau faisant l'objet d'un prélèvement réalisé dans le cadre du programme de surveillance de l'influenza, un prélèvement complémentaire d'encéphale pourrait être effectué et transmis à l'IRVT pour recherche du VWN. L'isolement des souches virales serait réalisé en collaboration avec le laboratoire de référence européen pour la FWN : UMR Virologie, à l'Anses de Maisons-Alfort (France).

Outre la détection éventuelle de mortalité de masse, le suivi sérologique des espèces d'oiseaux domestiques et péri-domestiques est considéré comme un indicateur sensible de la transmission du VWN [Jourdain et al., 2008]. A cet égard, notre étude a montré que les Oies cendrées (*Anser anser*) et les Etourneaux sansonnets (*Sturnus vulgaris*) pourraient être des cibles pour cette surveillance de la faune sauvage. Il faudrait toutefois consolider les données obtenues suite à ce travail encore très préliminaire. Cependant, ces enquêtes sont coûteuses et ne peuvent être largement utilisées et ne peuvent en outre pas renseigner sur la date exacte de l'infection

Parallèlement à la surveillance chez les animaux, le volet humain de la surveillance passive cible la détection des infections neuro-invasives à VWN en réalisant des analyses de confirmation de VWN devant chaque cas cliniquement suspect, même en l'absence de circulation documentée du virus. La surveillance humaine est basée sur le signalement des cas suspects de FWN (méningite et méningo-encéphalite) par l'ensemble des établissements hospitaliers publics et les cliniques privées. Ce dispositif devrait être renforcé chaque année de mai à novembre, par des sensibilisations des médecins du secteur privé, des dispensaires et hôpitaux, et serait piloté par l'Observatoire national des maladies nouvelles et émergentes (ONMNE : créé en 2005, il a effectivement démarré en 2008. Ses principales missions sont la veille épidémiologique et

environnementale et l'évaluation du risque de propagation des maladies émergentes en Tunisie). L'objectif général de cette surveillance serait de détecter précocement la transmission du VWN à l'homme afin de mettre en œuvre rapidement et de façon coordonnée des mesures de contrôles des populations vecteurs et de protection individuelle des personnes.

La surveillance événementielle pourrait être complétée par un programme de surveillance syndromique dont l'objectif serait d'identifier des agrégats de malades avant de disposer d'une confirmation du diagnostic par le laboratoire [Buehler, 2004, Henning, 2004]. L'analyse rétrospective de l'épizootie de 2004 en Camargue (France) a montré que la surveillance syndromique des chevaux aurait permis de fournir une alerte 4 semaines avant le début de la période épizootique. Ce délai aurait été suffisant pour permettre aux autorités sanitaires la mise en œuvre d'actions de démoustication ciblées dans les zones à risque [Leblond et al., 2005]. Cette surveillance syndromique chez les équidés repose sur une sensibilisation et une formation des vétérinaires praticiens à la sémiologie, au diagnostic et à la surveillance de l'infection à VWN. En Tunisie, une application possible serait de mettre en place la surveillance des cas neurologiques chez les équidés, ce qui est déjà en partie réalisé dans le cadre de la surveillance de la rage.

3 Comment prévenir la fièvre West Nile en Tunisie ?

3.1 Vaccination des chevaux dans les zones à haut risque

La dissémination rapide et considérable de l'infection à VWN aux USA a conduit les laboratoires pharmaceutiques à développer des vaccins contre cette maladie. Les recherches sur un vaccin humain sont en cours, mais des vaccins pour chevaux existent (Tableau 16). Un vaccin mis au point en Israël utilise une souche vivante atténuée du VWN qui protège 75 % des animaux après une seule injection et 94 % des vaccinés après une deuxième injection 15 jours plus tard [Malkinson et al., 2001].

Nom commercial	Société	Type de vaccin
Duvaxyn WNV	Fort Dodge	Inactivé
West Nile-Innovator	Fort Dodge	Plasmide ADN recombinant
Recombitek	Merial	Recombinant canarypox
PreveNile	Intervet	Virus chimérique fièvre jaune - WNV

Tableau 16. Vaccins contre le virus West Nile disponibles chez les chevaux.

Un vaccin pour chevaux, mis au point et commercialisé par les laboratoires Fort Dodge (West Nile Innovator®) et breveté par le Centre for Veterinary Biologics (CVB9), Iowa, est disponible depuis 2001 aux Etats-Unis. Au Maroc un vaccin recombinant Recombitek (10 USD / dose) a été utilisé en 2010. Tous ces vaccins équin restent cependant peu utilisés (Tableau 17), notamment en raison de leur prix élevé et de la rareté des cas cliniques en Afrique du Nord, contrairement à ce qui est observé aux USA.

Pays	Vaccin utilisé	Laboratoire	Doses / an
Autriche	Duvaxyn WNV	Fort Dodge	100
Hongrie	Duvaxyn WNV	Fort Dodge	2.000
Israël	Duvaxyn WNV	Fort Dodge	7.500
Maroc	Recombitek	Merial	5.000 (2010)

Tableau 17. Vaccinations annuelles contre le virus West Nile chez les chevaux dans quelques pays infectés.

Les enquêtes sérologiques réalisées chez les équidés en Tunisie depuis l'étude d'Haddad (1980) ont montré la forte circulation de VWN chez les équidés, alors que les cas cliniques sont rares ou inexistant. Dans ces circonstances l'utilisation des vaccins pour toute la population équine reste injustifiée. Il est néanmoins possible, voire prudent, de protéger les équidés de grande valeur (par exemple : chevaux de course ou reproducteurs des haras nationaux) en les vaccinant. Je propose de conseiller aux éleveurs de vacciner ces animaux dans les zones à haut risque, avant la période de circulation virale, c'est-à-dire en hiver. Il faudra toutefois expliquer clairement aux éleveurs et aux vétérinaires que la vaccination des équidés n'a cependant aucun impact

sur l'épidémiologie de la FWN, et il n'y a de toute manière pas de transmission virale du cheval à l'homme.

3.2 Diminution du contact entre hôtes et vecteurs

3.2.1 Mesures de protection individuelle

En cas de circulation du VWN, les mesures de protection individuelle revêtent une grande importance dans la réduction du risque de transmission du virus, en l'absence de moyens permettant d'éliminer ce risque :

- Port de vêtements adéquats, amples et longs
- Utilisation de répulsifs cutanés
- Vérification de l'étanchéité des portes et fenêtres,
- Conseil d'utilisation de moustiquaires, de préférence imprégnées industriellement d'insecticide (pyréthrinoïde, qui agit également comme répulsif avec une efficacité variant en fonction des concentrations, des produits utilisés et des espèces de moustiques) : moustiquaires de lit, de porte ou de fenêtre. La moustiquaire de lit constitue une barrière efficace pour se protéger des piqûres de moustiques, en particulier de *Culex pipiens* dont l'activité est essentiellement nocturne et surtout chez les personnes à risque d'expression clinique de VWN (personnes âgées, immunodéprimées).
- Conseil d'imprégnations de tissus (rideaux, vêtements) avec des insecticides qui sont absorbés dans les fibres et s'évaporent ensuite très lentement, augmentant la rémanence du produit appliqué (le plus souvent : pyréthrinoïdes). Ceci offre des avantages en termes de persistance, de coût et de sécurité d'emploi : le contact avec la peau est fortement réduit par rapport à une application cutanée. L'utilisation éventuelle de produits répulsifs sur les vêtements ou de vêtements imprégnés d'insecticides doit être complétée par l'application de répulsif sur les parties découvertes du corps : visage, cou, mains...
- Conseil de limitation des activités en extérieur des personnes exposées au risque de piqûre aux heures pendant lesquelles les moustiques sont les plus actifs.

Dans ce cadre de protection individuelle, il est possible d'utiliser les méthodes insecticides suivantes : aérosols de confort pour une utilisation domestique ponctuelle, insecticide à diffusion continue sous forme de plaquette chauffante (prise électrique) ou sous forme liquide (diffuseur électrique) pour l'intérieur. La climatisation ou de la ventilation (brasseur d'air) peuvent constituer des mesures d'appoint surtout si elles sont associées à une bonne qualité d'étanchéité des locaux et à l'usage d'insecticides.

3.2.2 Lutte anti-vectorielle

L'objectif principal de la lutte anti vectorielle (LAV) est de minimiser l'impact du VWN sur la santé humaine en réduisant, de manière préventive, la densité des moustiques par la mise en œuvre d'actions précoces et ciblées. Compte tenu de la connaissance encore incomplète de l'écologie et de l'épidémiologie de cette arbovirose et des données disponibles sur l'efficacité des mesures de contrôle, la LAV ne peut supprimer tout risque d'occurrence de cas humains. Les opérations de contrôle sont en effet susceptibles de réduire le risque de piqûre mais ne peuvent en aucun cas le supprimer ; l'expérience des Etats-Unis en témoigne.

La LAV est très coûteuse, et doit s'appuyer sur un ensemble coordonné de mesures de contrôle. Les difficultés à résoudre sont très différentes selon que l'on a affaire à une transmission virale urbaine ou rurale. En outre, les insecticides présentant un risque non négligeable pour l'environnement (impact sur les espèces protégées et les chaînes trophiques) et pour l'homme, leur utilisation doit être faite dans le cadre d'une approche intégrée et de réponse proportionnée au risque.

Ainsi, la lutte mécanique par la destruction des gîtes larvaires potentiels ou actifs doit être privilégiée et encouragée. Cette réduction des gîtes passe par des actions de salubrité de l'environnement (ramassage et élimination des déchets, entretien des terrains et des voies de circulation, curage des fossés...), par la mise en place de solutions pérennes et non chimiques (protection mécanique des récipients de stockage d'eau pluviale, conception des réseaux hydrauliques domestiques (gouttières, regards d'eau pluvial...) évitant les stagnations d'eau.

Les collectivités locales et les acteurs économiques concernés (secteurs de l'hôtellerie et de la restauration, établissements d'enseignement...) doivent être sensibilisés et associés en permanence à la destruction des gîtes domiciliaires. Lorsque la destruction

de ces gîtes ne peut être réalisée, l'opportunité d'un traitement larvicide sera alors étudiée.

Les traitements adulticides, du fait de leur impact potentiel sur l'homme et l'environnement ainsi que de leur efficacité temporaire sont réservés aux situations de très fortes nuisances ou lors de la mise en évidence d'une circulation virale notamment en zone urbaine.

La décision de mise en œuvre de ces traitements devra, quel que soit le niveau de risque observé (mortalité aviaire, cas équin, cas humain), être basée sur une estimation du risque vectoriel et environnemental lié à l'emploi de ces substances.

3.3 Stratégie opérationnelle

En Tunisie le réseau national de surveillance de la FWN implique de nombreux acteurs de la santé animale et publique tels que l'Observatoire National des Maladies Nouvelles et Emergentes (Ministère de la Santé Publique), la DGSV, le CNVZ, l'IRVT, l'ENMV, l'IPT, la FNARC, les CRDA des gouvernorats à risque, et les vétérinaires de libres pratiques. L'objectif de la stratégie est de limiter la propagation du virus et prévenir l'exposition des personnes au virus. Les mesures de gestion devraient être déclenchées de façon graduée en fonction des données de la surveillance. La stratégie de réponse prendrait en compte l'ensemble des données récentes acquises en Tunisie et à l'étranger. Les données de la surveillance permettraient d'estimer l'importance de l'activité virale et donc du risque pour la santé humaine dans une région ou zone donnée.

Trois niveaux de risque peuvent être identifiés :

- Niveau 1 : mise en évidence de circulation du VWN dans l'avifaune sauvage et domestique, y compris la mortalité aviaire,
- Niveau 2 : occurrence de cas équins, purement théorique actuellement en raison de l'absence de cas observés jusqu'à présent chez les chevaux en Tunisie,
- Niveau 3 : occurrence de cas humains.

La mise en évidence d'une circulation virale (niveau 1) conduit à renforcer le dispositif de surveillance afin d'identifier l'étendue et l'intensité de la circulation virale. Ce dispositif consiste essentiellement en une information et une sensibilisation des acteurs

de la santé humaine et animale et en des investigations spécifiques autour des foyers de circulation virale identifiés afin de repérer le plus précocement possible un passage aux niveaux 2 et 3.

La stratégie d'intervention dépendrait du niveau de risque observé et s'articulerait en six volets :

1. Renforcement de la surveillance humaine et investigation autour des cas. Pour le risque de niveau 1 : il faudrait informer les établissements de soins de base des délégations et les hôpitaux des gouvernorats concerné sur cette émergence virale afin de leur recommander une vigilance particulière. Pour les niveaux 2 et 3, il faudrait mettre en alerte les établissements hospitaliers (information et sensibilisation) et centres de transfusion sanguine en s'appuyant sur l'Observatoire National des Maladies Nouvelles et Emergentes.

Ce renforcement de la surveillance se traduirait également par des enquêtes épidémiologiques pilotées par l'Observatoire National des Maladies Nouvelles et Emergentes dans les délégations et gouvernorats, avec l'appui des directions régionales de la santé, de l'IPT et du Ministère de l'Agriculture. L'objectif serait d'identifier les zones potentielles d'exposition au VWN. Une recherche active rétrospective et prospective des cas serait alors mise en œuvre dans les hôpitaux de la zone concernée avec un renforcement de la surveillance humaine sur l'ensemble du territoire pour détecter les cas ayant séjourné dans la zone de transmission du virus mais éventuellement hospitalisés dans un autre gouvernorat. La Direction générale de santé de base enverrait alors un communiqué à l'ensemble des établissements de santé et aux laboratoires pour réduire les délais de traitement des prélèvements adressés dans le cadre de la surveillance humaine.

2. Renforcement de la surveillance équine et investigations autour des foyers de circulation du VWN. Pour le niveau 1, la DGSV informerait les vétérinaires de la zone à risque identifiée, afin de les inviter à une vigilance particulière vis à vis de la détection des cas équins. Pour les niveaux 2 et 3 : il s'agirait de mettre en alerte des vétérinaires de la zone à risque identifiée, élargie aux secteurs limitrophes, afin de détecter le plus rapidement possible les cas équins et mesurer ainsi l'importance et l'étendue de la circulation virale. Des enquêtes seraient réalisées par la Direction régionale de la production animale concernée pour statuer sur le caractère

autochtone des cas et rechercher d'éventuels autres cas. La DGSV demanderait à l'IRVT de réduire les délais de traitement des prélèvements adressés dans le cadre de la surveillance animale. L'IPT serait sollicité pour rechercher le VWN sur les cas d'encéphalite ou méningo-encéphalite équine d'étiologie non rabique.

Des enquêtes de séroprévalence (notamment recherche d'IgM) chez les chevaux pourraient être réalisées par les CNVZ autour des cas équins voire humains pour mieux caractériser l'intensité de l'activité virale. Ces enquêtes permettraient de confirmer le caractère autochtone des cas, de préciser l'étendue de l'épidémie et d'apprécier le caractère récent ou ancien des contaminations.

3. Renforcement de la surveillance de l'avifaune : dès le niveau 1 et a fortiori lors des niveaux 2 et 3, mettre en alerte via la DGSV les organisations impliquées dans la gestion ou l'étude de la faune sauvage (associations de chasseurs, associations ornithologiques), dans les gouvernorats ayant des sites Ramsar et des zones protégées.
4. Activation de la surveillance entomologique pour mettre en évidence les espèces culicidiennes impliquées dans la transmission du VWN et détecter le virus circulant. Ces travaux impliqueraient notamment l'IPT et l'IRVT.
5. Information du public sur les mesures de protection individuelle permettant de réduire l'exposition aux piqûres de moustiques et au risque de transmission du VWN, et aux précautions à prendre lors de la mise en œuvre des traitements adulticides sur les populations de moustiques.
6. Lutte anti-vectorielle pour contrôler les populations de moustiques : la stratégie de la lutte anti vectorielle est fonction des niveaux de risque. En l'absence de circulation visible du virus et dans une zone sans précédent épizootique, il s'agirait de promouvoir la réduction du risque à la source, par la suppression ou le contrôle des gîtes larvaires d'origine anthropique à proximité des habitations. En cas de circulation virale avérée (niveau 1 à 3), les mesures de lutte anti vectorielle seraient décidées en fonction du risque identifié pour l'homme. Les objectifs seraient de :
 - a. Réduire le risque de transmission virale à la source, par la suppression des gîtes larvaires d'origine anthropique à proximité des habitations ; si nécessaire, appliquer des larvicides ;

- b. Envisager très localement des traitements aduIticides si les populations d'adultes excèdent des niveaux habituels sur les sites à activité humaine.

Références bibliographiques

Abbassy, M., Osman, M. et Marzouk, A. (1993). West Nile virus (Flaviviridae:Flavivirus) in experimentally infected Argas ticks (Acari:Argasidae). *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 48(5):726–737.

Agüero, M., Fernández-Pinero, J., Buitrago, D., Sánchez, A., Elizalde, M., San Miguel, E., Villalba, R., Llorente, F. et Jiménez-Clavero, M. A. (2011). Bagaza virus in partridges and pheasants, Spain, 2010. *Emerg Infect Dis*, 17(8):1498–1501.

Akhter, R., Hayes, C. G., Baqar, S. et Reisen, W. K. (1982). West Nile virus in Pakistan. III. Comparative vector capability of *Culex tritaeniorhynchus* and eight other species of mosquitoes. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 76(4):449–453.

Alerstam, T. (1990). *Bird migration*. Cambridge University Press. Translated by Christie, D. A.

Allan, B. F., Langerhans, R. B., Ryberg, W. A., Landesman, W. J., Griffin, N. W., Katz, R. S., Oberle, B. J., Schutzenhofer, M. R., Smyth, K. N., de St Maurice, A., Clark, L., Crooks, K. R., Hernandez, D. E., McLean, R. G., Ostfeld, R. S. et Chase, J. M. (2009). Ecological correlates of risk and incidence of West Nile virus in the United States. *Oecologia*, 158(4):699–708.

Amari, M. et Azafzaf, H. (2011). Tunisia. In *Important bird areas in Africa and associated island: priority sites for conservation*, volume 11 de *BirdLife Conservation Series*, pages 953–973. Newbury and Cambridge, UK: Pisces Publications and BirdLife International.

Anderson, J. F., Main, A. J., Andreadis, T. G., Wikel, S. K. et Vossbrinck, C. R. (2003). Transstadial transfer of West Nile virus by three species of ixodid ticks (Acari: Ixodidae). *J. Med. Entomol.*, 40(4):528–533.

Andreadis, T. G., Anderson, J. F., Vossbrinck, C. R. et Main, A. J. (2004). Epidemiology of West Nile virus in Connecticut: a five-year analysis of mosquito data 1999-2003. *Vector Borne Zoonotic Dis.*, 4(4):360–378.

Angelini, P. et all (22 April 2010). West Nile virus circulation in Emilia-Romagna, Italy: the integrated surveillance system 2009. *Euro Surveill.*, Volume 15:Issue 16.

Angelini, P., Tamba, M., Finarelli, A. C., Bellini, R., Albieri, A., Bonilauri, P., Cavrini, F., Dottori, M., Gaibani, P., Martini, E., Mattivi, A., Pierro, A. M., Rugna, G., Sambri, V.,

- Squintani, G. et Macini, P. (2010). West Nile virus circulation in Emilia-Romagna, Italy: the integrated surveillance system 2009. *Euro Surveill.*, 15(16).
- Apperson, C. S., Harrison, B. A., Unnasch, T. R., Hassan, H. K., Irby, W. S., Savage, H. M., Aspen, S. E., Watson, D. W., Rueda, L. M., Engber, B. R. et Nasci, R. S. (2002). Host-feeding habits of *Culex* and other mosquitoes (Diptera: Culicidae) in the Borough of Queens in New York City, with characters and techniques for identification of *Culex* mosquitoes. *J. Med. Entomol.*, 39(5):777–785.
- Artois, M. (2009). Cours de l'Unité de Santé Publique Vétérinaire. In *Vet Agro Sup Campus Vétérinaire de Lyon*.
- Austgen, L. E., Bowen, R. A., Bunning, M. L., Davis, B. S., Mitchell, C. J. et Chang, G.-J. J. (2004). Experimental infection of cats and dogs with West Nile virus. *Emerg. Infect. Dis.*, 10(1):82–86.
- Austin, R. J., Whiting, T. L., Anderson, R. A. et Drebot, M. A. (2004). An outbreak of West Nile virus-associated disease in domestic geese (*Anser anser domesticus*) upon initial introduction to a geographic region, with evidence of bird to bird transmission. *Can. Vet. J.*, 45(2):117–123.
- Azafzaf, H. et Feltrup-azafzaf, C. (2009). Dénombrement des Oiseaux d'eau en Tunisie. *Groupe Tunisien d'Ornithologie (GTO), Association "Les Amis des Oiseaux" (AAO)*.
- Bahri, O., Dhifallah, I., Alaya-Bouafif, N. B., Fekih, H., Gargouri, J. et Triki, H. (2010). Étude séroépidémiologique de la circulation du virus West Nile chez l'Homme en Tunisie [Sero-epidemiological study of West Nile virus circulation in human in Tunisia.]. *Bull. Soc. Pathol. Exot.*, 104:1–5.
- Bakonyi, T., Ivanics, E., Erdélyi, K., Ursu, K., Ferenczi, E., Weissenböck, H. et Nowotny, N. (2006). Lineage 1 and 2 strains of encephalitic West Nile virus, central Europe. *Emerg. Infect. Dis.*, 12(4):618–623.
- Balenghien, T., Fouque, F., Sabatier, P. et Bicout, D. (2006). Horse, bird and human-seeking behavior and seasonal abundance of mosquitoes in a West Nile virus focus of southern France. *J. Med. Entomol.*, 43 (5) :936–46.
- Baqar, S., Hayes, C. G., Murphy, J. R. et Watts, D. M. (1993). Vertical transmission of West Nile virus by *Culex* and *Aedes* species mosquitoes. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 48(6):757–762.
- Barr, A. R. (1981). The *Culex pipiens* Complex. Cytogenetics and Genetics of Vectors. *Tokyo, Elsevier Biomedical Press*, pages 123–36.

- Barton, K. (2012). *MuMIn: Multi-model inference*. R package version 1.7.11.
- Beasley, D. W. C. (2005). Recent advances in the molecular biology of west nile virus. *Curr. Mol. Med.*, 5(8):835–850.
- Beasley, D. W. C. (2011). Vaccines and immunotherapeutics for the prevention and treatment of infections with West Nile virus. *Immunotherapy*, 3(2):269–285.
- Beasley, D. W. C. et Barrett, A. D. T. (2002). Identification of neutralizing epitopes within structural domain III of the West Nile virus envelope protein. *J. Virol.*, 76(24):13097–13100.
- Beasley, D. W. C., Davis, C. T., Whiteman, M., Granwehr, B., Kinney, R. M. et Barrett, A. D. T. (2004). Molecular determinants of virulence of West Nile virus in North America. *Arch. Virol. Suppl.*, (18):35–41.
- Becker, N., Jöst, H., Ziegler, U., Eiden, M., Höper, D., Emmerich, P., Fichet-Calvet, E., Ehichioya, D. U., Czajka, C., Gabriel, M., Hoffmann, B., Beer, M., Tenner-Racz, K., Racz, P., Günther, S., Wink, M., Bosch, S., Konrad, A., Pfeffer, M., Groschup, M. H. et Schmidt-Chanasit, J. (2012). Epizootic emergence of Usutu virus in wild and captive birds in Germany. *PLoS One*, 7(2):e32604.
- Ben Hassine, T., Hammami, S., Elghoul, H. et Ghram, A. (2011). Detection of circulation of West Nile virus in equine in the north-west of Tunisia. *Bull. Soc. Pathol. Exot.*, Oct;104(4):266–71.
- Bengis, R. G., Leighton, F. A., Fischer, J. R., Artois, M., Mörner, T. et Tate, C. M. (2004). The role of wildlife in emerging and re-emerging zoonoses. *Rev. Sci. Tech.*, 23(2):497–511.
- Bennett, S., Woods, T., Liyanage, W. M. et Smith, D. L. (1991). A simplified general method for cluster-sample surveys of health in developing countries. *World Health Stat. Q.*, 44(3):98–106.
- Berezin, V. (1971). Investigation of the ecology of arboviruses in river deltas of the Caspian and Azov Sea basins translation from Russian by NAMRU3 - T1160 . Mémoire de D.E.A., Unpublished Thesis, Moska, SSRR, Inst Polio Virus Entsef Akad Nauk. 37 p.
- Bergaoui, R., Sghaier, S., Ben Hassen, S. et Hammami, S. (2007). La maladie de West Nile chez les Équidés : enquête séroépidémiologique dans six régions de la Tunisie. In *Troisièmes Journées Scientifiques de Microbiologie*.

- Bernard, K. A., Maffei, J. G., Jones, S. A., Kauffman, E. B., Ebel, G., Dupuis, 2nd, A., Ngo, K. A., Nicholas, D. C., Young, D. M., Shi, P. Y., Kulasekera, V. L., Eidson, M., White, D. J., Stone, W. B., Kramer, L. D. et N. Y State West Nile Virus Surveillance Team (2001). West Nile virus infection in birds and mosquitoes, New York State, 2000. *Emerg. Infect. Dis.*, 7(4):679–685.
- Berthet, F. X., Zeller, H. G., Drouet, M. T., Rauzier, J., Digoutte, J. P. et Deubel, V. (1997a). Extensive nucleotide changes and deletions within the envelope glycoprotein gene of Euro-African West Nile viruses. *J. Gen. Virol.*, 78 (Pt 9):2293–2297.
- Berthet, F. X., Zeller, H. G., Drouet, M. T., Rauzier, J., Digoutte, J. P. et Deubel, V. (1997b). Extensive nucleotide changes and deletions within the envelope glycoprotein gene of Euro-African West Niles. *J. Gen. Virol.*, 78:2293–7.
- Biedenbender, R., Bevilacqua, J., Gregg, A. M., Watson, M. et Dayan, G. (2011). Phase II, randomized, doubleblind, placebocontrolled, multicenter study to investigate the immunogenicity and safety of a West Nile virus vaccine in healthy adults. *J. Infect. Dis.*, 203(1):75–84.
- Bivand, R., Pebesma, E. et Gómez-Rubio, V. (2008). *Applied spatial data analysis with R*. Use R! Springer New York.
- Blackburn, N. K., Reyers, F., Berry, W. L. et Shepherd, A. J. (1989). Susceptibility of dogs to West Nile virus: a survey and pathogenicity trial. *J. Comp. Pathol.*, 100(1):59–66.
- Bonaduce, A., Compagnucci, M., Bonaduce, D., Arpentì, C. et Martone, F. (1977). Studies on the occurrence and distribution of HI antibodies against some arboviruses in the serum of domestic mammals in Puglia. *Folia Vet. Lat.*, 7(2):145–157.
- Bondre, V. P., Jadi, R. S., Mishra, A. C., Yergolkar, P. N. et Arankalle, V. A. (2007). West nile virus isolates from india: evidence for a distinct genetic lineage. *J. Gen. Virol.*, 88(Pt 3):875–884.
- Bouatour, A. et Rhaïem, A. and Ghrammam, M. Y. H. (1998). Rapport d'enquête entomologique suite à l'apparition des cas de West Nile. Rapport technique, Institut Pasteur de Tunis. Laboratoire d'entomologie médicale.
- Boubaker, M. (2008). Contribution à l'étude des maladies nerveuses de groupe chez les Équidés en Tunisie. Thèse méd. vét., École Nationale de Médecine Vétérinaire de Sidi Thabet.

- Brault, A. C., Huang, C. Y.-H., Langevin, S. A., Kinney, R. M., Bowen, R. A., Ramey, W. N., Panella, N. A., Holmes, E. C., Powers, A. M. et Miller, B. R. (2007). A single positively selected West Nile viral mutation confers increased virogenesis in American crows. *Nat. Genet.*, 39(9):1162–1166.
- Brinton, M. A. (2002). The molecular biology of West Nile Virus: a new invader of the western hemisphere. *Annu. Rev. Microbiol.*, 56:371–402.
- Brownstein, J., Rosen, H., Purdy, D., Miller, J., Merlino, M., Mostashari, F. et Fish, D. (2002). Spatial analysis of West Nile virus: rapid risk assessment of an introduced vector-borne zoonosis. *Vector Borne Zoonotic Dis.*, 2(3):157–164.
- Bryant, R. et Rainey, M. (2002). Investigation of flood inundation on playas within the Zone of Chotts, using a time-series of AVHRR. *Remote Sens. Environ.*, 82(2-3):360 – 375.
- Buckweitz, S., Kleiboeker, S., Marioni, K., Ramos-Vara, J., Rottinghaus, A., Schwabenton, B. et Johnson, G. (2003). Serological, reverse transcriptase-polymerase chain reaction, and immunohistochemical detection of West Nile virus in a clinically affected dog. *J. Vet. Diagn. Invest.*, 15(4):324–329.
- Buehler, J. W. (2004). Review of the 2003 National Syndromic Surveillance Conference—lessons learned and questions to be answered. *MMWR Morb. Mortal. Wkly. Rep.*, 53 Suppl:18–22.
- Bunning, M. L., Bowen, R. A., Cropp, C. B., Sullivan, K. G., Davis, B. S., Komar, N., Godsey, M. S., Baker, D., Hettler, D. L., Holmes, D. A., Biggerstaff, B. J. et Mitchell, C. J. (2002). Experimental infection of horses with West Nile virus. *Emerg. Infect. Dis.*, 8(4):380–386.
- Burnham, K. P. et Anderson, D. R. (2002). *Model selection and multimodel inference: a practical information-theoretic approach*. Springer-Verlag, New-York, 2nd édition.
- C. Chapel, I. Vuillermoz, N. Z. C. T. F. Z. D. D. (2004). Rôle de la glycosylation des protéines d'enveloppe dans la morphogénèse des Flaviviridae et son inhibition par des antiviraux de nouvelles générations. *Virologie*, Volume, Numéro 2:95–111.
- Cabre, O., Grandadam, M., Marié, J.-L., Gravier, P., Prangé, A., Santinelli, Y., Rous, V., Bourry, O., Durand, J.-P., Tolou, H. et Davoust, B. (2006). West Nile Virus in horses, sub-Saharan Africa. *Emerg. Infect. Dis.*, 12(12):1958–1960.
- Calisher, C. H., Karabatsos, N., Dalrymple, J. M., Shope, R. E., Porterfield, J. S., Westaway, E. G. et Brandt, W. E. (1989). Antigenic relationships between flaviviruses as determined by cross-neutralization tests with polyclonal antisera. *J. Gen. Virol.*, 70 (Pt 1):37–43.

- Calistri, P., Giovannini, A., Hubalek, Z., Ionescu, A., Monaco, F., Savini, G. et Lelli, R. (2010). Epidemiology of West Nile in Europe and in the Mediterranean basin. *Open Virol. J.*, 4:29–37.
- Calistri, P., Giovannini, A., Savini, G. et al (2009a). West Nile Virus Transmission in 2008 in North-Eastern Italy. *Zoonoses Public Health*, doi: 10.1111/j:1863–2378.2009.01303.x.
- Calistri, P., Giovannini, A., Savini, G., Monaco, F., Bonfanti, L., Ceolin, C., Terregino, C., Tamba, M., Cordioli, P. et Lelli, R. (2009b). West Nile virus transmission in 2008 in north-eastern Italy. *Zoonoses Public Health*, 57(3):211–219.
- Campbell, G. L., Marfin, A. A., Lanciotti, R. S. et Gubler, D. J. (2002). West Nile Vrus. *Lancet Infect. Dis.*, 2(9):519–529.
- Cannon, A. B., Luff, J. A., Brault, A. C., MacLachlan, N. J., Case, J. B., Green, E. N. G. et Sykes, J. E. (2006). Acute encephalitis, polyarthrititis, and myocarditis associated with West Nile virus infection in a dog. *J. Vet. Intern. Med.*, 20(5):1219–1223.
- Cantile, C., Di Guardo, G., Eleni, C. et Arispici, M. (2000). Clinical and neuropathological features of West Nile virus equine encephalomyelitis in Italy. *Equine Vet. J.*, 32(1):31–35.
- Castillo-Olivares, J., Mansfield, K. L., Phipps, L. P., Johnson, N., Tearle, J. et Fooks, A. R. (2011). Antibody response in horses following experimental infection with West Nile Virus lineages 1 and 2. *Transbound. Emerg. Dis.*, 58(3):206–212.
- Ceccaldi, P.-E., Lucas, M. et Despres, P. (2004). New insights on the neuropathology of West Nile virus. *FEMS Microbiol. Lett.*, 233(1):1–6.
- Cernescu, C., Nedelcu, N.I., Tardei, G., Ruta, S. et Tsai, T.F. (2000a). Continued transmission of West Nile virus to humans in southeastern Romania, 1997-1998. *J. Infect. Dis.*, 181(2):710–712.
- Cernescu, C., Nedelcu, N.I., Tardei, G., Ruta, S. et Tsai, T.F. (2000b). Continued transmission of West Nile virus to humans in southeastern Romania, 1997-1998. *J. Infect. Dis.*, 181(2):710–712.
- Charrel, R., Brault, A., Gallian, P., Lemasson, J., Murgue, B., Murri, S., Pastorino, B., Zeller, H., de Chesse, R., de Micco, P. et de Lamballerie, X. (2003). Evolutionary relationship between Old World West Nile virus strains. Evidence for viral gene flow between Africa, the Middle East, and Europe. *Virology*, 315(2):381–388.

- Chaskopoulou, A., Dovas, C. I., Chaintoutis, S. C., Bouzalas, I., Ara, G. et Papanastassopoulou, M. (2011). Evidence of enzootic circulation of West Nile virus (Nea Santa-Greece-2010, lineage 2), Greece, May to July 2011. *Euro Surveill*, 16(31):pii=19933.
- Chastel, C., Bach-Hamba, D., Launay, H., Le Lay, G., Hellal, H. et Beaucournu, J. C. (1983). Arbovirus infections in Tunisia: new serological survey of small wild mammals. *Bull. Soc. Pathol. Exot. Filiales*, 76(1):21–33.
- Chastel, C., Rogues, G., Beaucournu-Saguez, F., Hellal, H., Le Goff, F. et Beaucournu, J. C. (1977). Mixed sero-epidemiologic study of arbovirus-arenavirus in the small mammals of Tunisia. *Bull. Soc. Pathol. Exot. Filiales*, 70(5):471–479.
- Chevalier, V., Dupressoir, A., Tran, A., Diop, O., Gottland, C., Diallo, M., Etter, E., Ndiaye, M., Grosbois, V., Dia, M., Gaidet, N., Sall, A., Soti, V. et Niang, M. (2010). Environmental risk factors of West Nile virus infection of horses in the Senegal River basin. *Epidemiol. Infect.*, 138(11):1601–1609.
- Chevalier, V., Lancelot, R., Diaité, A., Mondet, B., Sall, B. et De Lamballerie, X. (2006). Serological assessment of West Nile fever virus activity in the pastoral system of Ferlo, Senegal. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 1081:216–225.
- Chowers, M. Y., Lang, R., Nassar, F., Ben-David, D., Giladi, M., Rubinshtein, E., Itzhaki, A., Mishal, J., Siegman-Igra, Y., Kitzes, R., Pick, N., Landau, Z., Wolf, D., Bin, H., Mendelson, E., Pitlik, S. D. et Weinberger, M. (2001). Clinical characteristics of the West Nile fever outbreak, Israel, 2000. *Emerg. Infect. Dis.*, 7(4):675–678.
- Clements, A. N. (1999). The biology of mosquitoes. *Sensory reception and behaviour*. London, Chapman & Hall, 2:740 p.
- Colton, L., Biggerstaff, B. J., Johnson, A. et Nasci, R. S. (2005). Quantification of West Nile virus in vector mosquito saliva. *J. Am. Mosq. Control Assoc.*, 21(1):49–53.
- Colton, L. et Nasci, R. S. (2006). Quantification of West Nile virus in the saliva of Culex species collected from the southern United States. *J. Am. Mosq. Control Assoc.*, 22(1):57–63.
- Comstedt, Pand Bergström, S., Olsen, B., Garpmo, U., Marjavaara, L. et Mejlön, H. (2006.). Migratory passerine birds as reservoirs of Lyme borreliosis in Europe. *Emerg. Infect. Dis.*, 12:1087–95.

- Dauphin, G. et Zientara, S. (2007a). West Nile virus: Recent trends in diagnosis and vaccine development. *Vaccine*, 25:5563 – 5576.
- Dauphin, G. et Zientara, S. (2007b). West Nile virus: recent trends in diagnosis and vaccine development. *Vaccine*, 25(30):5563–5576.
- Davidson, C. et Evans, P. R. (1986). The role and potential of man-made and man-modified wetlands in the enhancement of the survival of overwintering shorebirds. *Colon. Waterbirds*, 9:176–188.
- Davis, C., Todd, B., David, W. C., Guzman, H., Siirin, M., Parsons, R., Tesh, R. et Barrett, A. (2004). Emergence of attenuated West Nile virus variants in Texas, 2003. *Virology*, 330(1):342–350.
- Diamond, M. S. (2009). Progress on the development of therapeutics against West Nile virus. *Antiviral Res.*, 83(3):214–227.
- Direction générale des ressources en eau (2007). Annuaire pluviométrique de Tunisie. Année 2006-2007. Rapport technique, Ministère de l'agriculture et des ressources hydrauliques. 285 p.
- Donner, A. (1986). A Review of Inference Procedures for the Intraclass Correlation Coefficient in the One-Way Random Effects Model. *International Statistical Review*, 54:67–82.
- Dropsy, H. (2010). Les animaux sentinelles du risque sanitaire pour l'homme : actualités en matière de bioterrorisme. Thèse méd. vét., Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort.
- Dufour, B., Hendrikx, P. et B., T. (2006). Élaboration et mise en place de systèmes de surveillance épidémiologique des maladies à haut risque dans les pays développés. *Rev. sci. tech. Off. int. Epiz.*, 25(1):187–198.
- Edman, J. et Taylor, D. (1968). *Culex nigripalpus*: seasonal shift in the bird-mammal feeding ratio in a mosquito vector of human encephalitis. *Science*, 161 (836):67–8.
- Eidson, M., Kramer, L., Stone, W., Hagiwara, Y. et Schmit, K. (2001). Dead bird surveillance as an early warning system for West Nile virus. *Emerg. Infect. Dis.*, 7(4):631–635.
- Eisen, L. et Eisen, R. J. (2011). Using geographic information systems and decision support systems for the prediction, prevention, and control of vector-borne diseases. *Annu. Rev. Entomol.*, 56:41–61.

- El Ghouli, H. (2009). Renforcement de la surveillance et des systèmes d'alerte pour la fièvre catarrhale ovine, la fièvre du Nil Occidental et la rage au Maroc, en Algérie et en Tunisie - Fièvre du Nil Occidental : historique et situation épidémiologique en Tunisie. Projet GCP/RAB/002/FRA, FAO. 24 p.
- El hili, A. (2005). Les oiseaux migrateurs et la grippe aviaire en Tunisie. Newsletter Influenza aviaire DGSV Tunisie. Rapport technique, Newsletter Influenza aviaire DGSV Tunisie.
- Epstein, P. (2001). West Nile virus and the climate. *J. Urban Health*, 78:367–371. 10.1093/jurban/78.2.367.
- Epstein, P. R. (1999). Climate and health. *Science*, 285:347–348.
- Esteves, A., Almeida, A. P. G., Galão, R. P., Parreira, R., Piedade, J., Rodrigues, J. C., Sousa, C. A. et Novo, M. T. (2005). West Nile virus in Southern Portugal, 2004. *Vector Borne Zoonotic Dis.*, 5(4):410–413.
- Farajollahi, A., Crans, W. J., Nickerson, D., Bryant, P., Wolf, B., Glaser, A. et Andreadis, T. G. (2005). Detection of West Nile virus RNA from the louse fly *Icosta americana* (Diptera: Hippoboscidae). *J. Am. Mosq. Control Assoc.*, 21(4):474–476.
- Feki, I., Marrakchi, C., Ben Hmida, M., Belahsen, F., Ben Jemaa, M., Maaloul, I., Kanoun, F., Ben Hamed, S. et Mhiri, C. (2005). Epidemic West Nile virus encephalitis in Tunisia. *Neuroepidemiology*, 24(1-2):1–7.
- Fichet-Calvet, E. et Rogers, D. J. (2009). Risk maps of Lassa fever in West Africa. *PLoS Negl. Trop. Dis.*, 3(3):e388.
- Figuerola, J., Jiménez-Clavero, M. A., López, G., Rubio, C., Soriguer, R., Gómez-Tejedor, C. et Tenorio, A. (2008). Size matters: West Nile Virus neutralizing antibodies in resident and migratory birds in Spain. *Vet. Microbiol.*, 132(1-2):39–46.
- Figuerola, J., Jiménez-Clavero, M. A., Rojo, G., Gómez-Tejedor, C. et Soriguer, R. (2007). Prevalence of West Nile virus neutralizing antibodies in colonial aquatic birds in southern Spain. *Avian Pathol.*, 36(3):209–212.
- Filipe, A. (1972). Isolation in Portugal of West Nile virus from *Anopheles maculipennis* mosquitoes. *Acta Virol.*, 163:61.
- Filipe, A. R. et de Andrade, H. R. (1990). Arboviruses in the Iberian Peninsula. *Acta Virol.*, 34(6):582–591.

Filipponi G, L. R. et G, S. (February, 8-9 2005.). West Nile Virus surveillance in Italy: results of three years activities. *In National Conference on West Nile Virus in the United States, San Jose, California.*

Fonseca, D. M., Keyghobadi, N., Malcolm, C. A., Mehmet, C., Schaffner, F., Mogi, M., Fleischer, R. C. et Wilkerson, R. C. (2004). Emerging vectors in the *Culex pipiens* complex. *Science*, 303(5663):1535–1538.

Friend, M., McLean, R. et Dein, F. (2001). Disease emergence in birds: challenges for the twenty-first century. *The Auk*, 118:290–303.

Gabinaud, A., Vigo, G., Cousserans, J., Roux, M., Pasteur, N. et Croset, H. (1985). La mammophilie des populations de *Culex pipiens pipiens* L., 1758 dans le Sud de la France ; variations de ce caractère en fonction des biotopes de développement larvaire, des caractéristiques physico-chimiques de leurs eaux et des saisons. Conséquences pratiques et théoriques. *Cah - ORSTOM, Entomol méd XXIII*, 2:123–32.

Gaidet, N., Dodman, T., Caron, A., Balança, G., Desvaux, S., Goutard, F., Cattoli, G., Lamarque, F., Hagemeijer, W. et Monicat, F. (2007). Avian influenza viruses in water birds, Africa. *Emerg. Infect. Dis.*, 13(4):626–629.

Gallian, P., De Lamballerie, X., De Micco, P. et Andreu, G. (2005). West Nile virus (WNV): generalities and implications for blood transfusion. *Transfus. Clin. Biol.*, 12(1):11–17.

García-Bocanegra, I., Jaén-Téllez, J. A., Napp, S., Arenas-Montes, A., Fernández-Morente, M., Fernández-Molera, V. et Arenas, A. (2012). Monitoring of the West Nile Virus epidemic in Spain between 2010 and 2011. *Transbound. Emerg. Dis.*, 59(5):448–455.

Garmendia, A. E., Van Kruiningen, H. J., French, R. A., Anderson, J. F., Andreadis, T. G., Kumar, A. et West, A. B. (2000). Recovery and identification of West Nile virus from a hawk in winter. *J. Clin. Microbiol.*, 38(8):3110–3111.

Gaunt AS, O. L. (1997). Guidelines to the use of wild birds in research. *In The Ornithological Council.*

Gea-Banacloche, J., Johnson, R. T., Bagic, A., Butman, J. A., Murray, P. R. et Agrawal, A. G. (2004). West Nile virus: pathogenesis and therapeutic options. *Ann. Intern. Med.*, 140(7):545–553.

Genain, J., Grosbois, F. et Zientara, S. (2010). Fiche technique la fièvre West Nile. Rapport technique, Bibliothèque des Haras Nationaux.

- Ghram, A., Chabchoub, A., Boussetta, M., Baazaoui, S., Ibn Amor, H. et Landolsi, F. (1997). Enquête séroépidémiologique de la rhinopneumonie des équidés en Tunisie. *Élev. Méd. vét. Pays trop*, 4:273–276.
- Gingrich, J. B. et Williams, G. M. (2005). Host-feeding patterns of suspected West Nile virus mosquito vectors in Delaware, 2001-2002. *J. Am. Mosq. Control Assoc.*, 21(2):194–200.
- Glaser, A. (2004). West Nile virus and North America:An unfolding story. *Revue Scientifique et Technique de l'Office International des Epizooties*, 23:557–568.
- Glaser, R. L. et Meola, M. A. (2010). The native Wolbachia endosymbionts of *Drosophila melanogaster* and *Culex quinquefasciatus* increase host resistance to West Nile virus infection. *PLoS One*, 5(8):e11977.
- Gobbi, F., Napoletano, G., Piovesan, C., Russo, F., Angheben, A., Rossanese, A., Cattelan, A. M., Gallo, L., Valsecchi, M., Piazza, A., Venturi, G. et Bisoffi, Z. (2009). Where is West Nile fever? Lessons learnt from recent human cases in northern Italy. *Euro Surveill*, 14(10).
- Goldstein, H., Browne, W. et Rasbash, J. (2002). Partitioning variation in multilevel models. *Understanding Statistics*, 1(4):223–231.
- Griffiths, D. A. (1973). Maximum likelihood estimation for the beta-binomial distribution and an application to the household distribution of the total number of cases of a disease. *Biometrics*, 29(4):637–648.
- Guthrie, A. J., Howell, P., Gardner, I., Swanepoel, R., Nurton, J., Harper, C., Pardini, A., Groenewald, D. et Visage, C. (2003). West Nile virus infection of thoroughbred horses in South Africa (2000-2001). *Equine Vet. J.*, 35(6):601–605.
- Hachfi, W., Bougmiza, I., Bellazreg, F., Bahri, O., Kaabia, N., Bahri, F. et Letaief, A. (2010). Une deuxième épidémie de méningo-encéphalite à virus West Nile en Tunisie [Second epidemic of West Nile virus meningoencephalitis in Tunisia]. *Med. Mal. Infect.*, 40(8):456–461.
- Haddad, N. (1980). Contribution à l'étude séro-épidémio-clinique du virus West Nile chez les équidés en Tunisie. Thèse méd. vét., École Nationale de Médecine Vétérinaire, Sidi Thabet.

- Hamdi, N. et Chard Cheikhrouha, F. (2011). Estimation du nombre total des oiseaux aquatiques hivernant en Tunisie: période 2001/2002 à 2006/2007. *Rev. Écol. (Terre Vie)*, 66(3):231–253.
- Hannoun, C., Panthier, R., Mouchet, J. et Eouzan, J. (1964). Isolation in France of the West Nile virus from patients and from the vector *Culex modestus* Ficalbi. *C. R. Hebd. Séances Acad. Sci.*, 259:4170–4172.
- Hannoun, C. et Rau, U. (1970). Experimental transmission of certain arboviruses by *Argas reflexus reflexus*. *Folia Parasitol.*, 17:365–366.
- Harbach, R., Harrison, B. et Gad, A. (1984). *Culex* (*Culex*) *molestus* Forskal (Diptera: Culicidae): Neotype designation, description, variation, and taxonomic status. *Proc Entomol Soc Wash*, 86 (3):521–42.
- Harre, D. (2011). Etude MENAPOLIS et GEOPOLIS. Rapport technique.
- Hars, J. et all (2005a). Surveillance of West Nile virus in the avifauna of Southern France. In: 8th European Association of Avian Veterinarians Conference, Arles, France, 2005a. In *8th European Association of Avian Veterinarians Conference, Arles, France.*
- Hars, J., Mortamais, M., Pradel, J., Augé, P., Jourdain, E., Chavernac, D., Languille, J. et Zeller, H. (2008). Circulation du virus West Nile dans l'avifaune française. Bilan de sept années de surveillance. *Epidémiol. et Santé Anim.*, 53:29–41.
- Hastie, T. J. et Tibshirani, R. J. (1990). *Generalized additive models*, volume 43 de *Monographs on statistics and applied probability*. Chapman & Hall, London.
- Hayes, C. G. (2001). West Nile virus: Uganda, 1937, to New York City, 1999. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 951:25–37.
- Hayes, E. B., Komar, N., Nasci, R. S., Montgomery, S. P., O'Leary, D. R. et Campbell, G. L. (2005a). Epidemiology and transmission dynamics of West Nile virus disease. *Emerg. Infect. Dis.*, 11(8):1167–1173.
- Hayes, E. B., Sejvar, J. J., Zaki, S. R., Lanciotti, R. S., Bode, A. V. et Campbell, G. L. (2005b). Virology, pathology, and clinical manifestations of West Nile virus disease. *Emerg. Infect. Dis.*, 11(8):1174–1179.
- Heinz, f. (2000). Flaviviridae in: VAN REGENMORTEL, M.H.V, FAUQUET, C.M., BISHOP, D.H.L. et al. editors. *Virus taxonomy, classification and nomenclature of viruses* pp.859–

878. Rapport technique, 7th report of the international committee for the taxonomy of Viruses. San Diego: academic Press.

Henning, K. J. (2004). What is syndromic surveillance? *MMWR Morb. Mortal. Wkly. Rep.*, 53 Suppl:5–11.

Hubalek, Z. (2000). European experience with the West Nile virus ecology and epidemiology: could it be relevant for the new world? *Viral Immunol.*, 13(4):415–426.

Hubalek, Z. (2004). An annotated checklist of pathogenic microorganisms associated with migratory birds. *J. Wildl. Dis.*, 40:639–59.

Hubálek, Z. et Halouzka, J. (1999). West Nile fevera reemerging mosquito-borne viral disease in Europe. *Emerg. Infect. Dis.*, 5(5):643–650.

Hubálek, Z. et Halouzka, J. (1999). West Nile fever—a reemerging mosquito-borne viral disease in Europe. *Emerg. Infect. Dis.*, 5(5):643–650.

Hubálek, Z., Halouzka, J., Juricová, Z., Sikutová, S., Rudolf, I., Honza, M., Janková, J., Chytil, J., Marec, F. et Sitko, J. (2008). Serologic survey of birds for West Nile flavivirus in southern Moravia (Czech Republic). *Vector Borne Zoonotic Dis.*, 8(5):659–666.

Hughes, J. B., Daily, G. C. et Ehrlich, P. R. (1997). Population diversity: its extent and extinction. *Science*, 278(5338):689–692.

Hurlbut, H. S. (1956). West Nile virus infection in arthropods. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 5(1):76–85.

Hurlbut, H. S., Rizk, F., Taylor, R. M. et Work, T. H. (1956). A study of the ecology of West Nile virus in Egypt. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 5(4):579–620.

Hutcheson, H. J., Gorham, C. H., Machain-Williams, C., Loroño-Pino, M. A., James, A. M., Marlenee, N. L., Winn, B., Beaty, B. J. et Blair, C. D. (2005). Experimental transmission of West Nile virus (Flaviviridae: Flavivirus) by *Carios capensis* ticks from North America. *Vector Borne Zoonotic Dis.*, 5(3):293–295.

Ionescu, A., Bria, P., Rizac, V. et al. (2006). Some preliminary studies assesing the presence of West Nile virus antibodies in horses in Romania. *In Proceedings of the International Veterinary Vaccines and Diagnostics Conference; Oslo.*

Irma Glatt, a. R. H. (2012). Virus du Nil occidental Evaluation de la situation de la maladie en suisse. Rapport technique, office veterinaire federal (OVF), Berne.

- Jacob, B. J., Gu, W., Caamano, E. X. et Novak, R. J. (2009). Developing operational algorithms using linear and non-linear squares estimation in Python for the identification of *Culex pipiens* and *Culex restuans* in a mosquito abatement district (Cook County, Illinois, USA). *Geospat. Health*, 3(2):157–176.
- Jacobson, E. R., Ginn, P. E., Troutman, J. M., Farina, L., Stark, L., Klenk, K., Burkhalter, K. L. et Komar, N. (2005a). West Nile virus infection in farmed American alligators (*Alligator mississippiensis*) in Florida. *J. Wildl. Dis.*, 41(1):96–106.
- Jacobson, E. R., Johnson, A. J., Hernandez, J. A., Tucker, S. J., Dupuis, 2nd, A. P., Stevens, R., Carbonneau, D. et Stark, L. (2005b). Validation and use of an indirect enzyme-linked immunosorbent assay for detection of antibodies to West Nile virus in American Alligators (*Alligator mississippiensis*) in Florida. *J. Wildl. Dis.*, 41(1):107–114.
- Janovy, J. (1997). Protozoa, helminths, and arthropods of birds. In: Clayton, DH and Moore, J, ed. Host-parasite evolution: general principles and avian models . *Oxford: Oxford University Press*,, pages 303–337.
- Jiménez-Clavero, M. A., Sotelo, E., Fernandez-Pinero, J., Llorente, F., Blanco, J. M., Rodriguez-Ramos, J., Perez-Ramirez, E. et Höfle, U. (2008). West Nile virus in golden eagles, Spain, 2007. *Emerg. Infect. Dis.*, 14(9):1489–1491.
- Johnson, D. J., Ostlund, E. N., Pedersen, D. D. et Schmitt, B. J. (2001). Detection of North American West Nile virus in animal tissue by a reverse transcription-nested polymerase chain reaction assay. *Emerg. Infect. Dis.*, 7(4):739–741.
- Jourdain, E., Gauthier-Clerc, M., Bicout, D. J. et Sabatier, P. (2007a). Bird migration routes and risk for pathogen dispersion into western Mediterranean wetlands. *Emerg. Infect. Dis.*, 13(3):365–372.
- Jourdain, E., Gauthier-Clerc, M., Sabatier, P., Grège, O., Greenland, T., Leblond, A., Lafaye, M. et Zeller, H. G. (2008). Magpies as hosts for West Nile virus, southern France. *Emerg. Infect. Dis.*, 14(1):158–160.
- Jourdain, E., Olsen, B., Lundkvist, A., Hubálek, Z., Sikutová, S., Waldenström, J., Karlsson, M., Wahlström, M., Jozan, M. et Falk, K. I. (2011). Surveillance for West Nile virus in wild birds from northern Europe. *Vector Borne Zoonotic Dis.*, 11(1):77–79.
- Jourdain, E., Schuffenecker, I., Korimbocus, J., Reynard, S., Murri, S., Kayser, Y., Gauthier-Clerc, M., Sabatier, P. et Zeller, H. G. (2007b). West Nile virus in wild resident birds, Southern France, 2004. *Vector Borne Zoonotic Dis.*, 7(3):448–452.

- Jozan, M., Evans, R., McLean, R., Hall, R., Tangredi, B., Reed, L. et Scott, J. (2003). Detection of West Nile Virus infection in birds in the United States by blocking ELISA and immunohistochemistry. *Vector Borne Zoonotic Dis.*, 3(3):99–110.
- Jupp, P. G. (2001). The ecology of West Nile virus in South Africa and the occurrence of outbreaks in humans. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 951:143–152.
- Kalluri, S., Gilruth, P., Rogers, D. et Szczur, M. (2007). Surveillance of arthropod vector-borne infectious diseases using remote sensing techniques: a review. *PLoS Pathog.*, 3(10):1361–1371.
- Kaptoul, D., Viladrich, P. F., Domingo, C., Niubó, J., Martínez-Yélamos, S., De Ory, F. et Tenorio, A. (2007). West Nile virus in Spain: report of the first diagnosed case (in Spain) in a human with aseptic meningitis. *Scand. J. Infect. Dis.*, 39(1):70–71.
- Keesing, F., Holt, R. D. et Ostfeld, R. S. (2006). Effects of species diversity on disease risk. *Ecol. Lett.*, 9(4):485–498.
- Kile, J. C., Panella, N. A., Komar, N., Chow, C. C., MacNeil, A., Robbins, B. et Bunning, M. L. (2005). Serologic survey of cats and dogs during an epidemic of West Nile virus infection in humans. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 226(8):1349–1353.
- Kimura, T. et Ohyama, A. (1988). Association between the pH-dependent conformational change of West Nile flavivirus E protein and virus-mediated membrane fusion. *J Gen Virol*, 69 (Pt 6):1247–1254.
- Klenk, K. et Komar, N. (2003). Poor replication of West Nile virus (New York 1999 strain) in three reptilian and one amphibian species. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 69(3):260–262.
- Komar, N. (2000). West Nile viral encephalitis. *Rev. Sci. Tech.*, 19(1):166–176.
- Komar, N. (2001). West Nile virus surveillance using sentinel birds. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 951:58–73.
- Komar, N. (2003). West Nile virus: epidemiology and ecology in North America. *Adv. Virus Res.*, 61:185–234.
- Komar, N., Dohm, D. J., Turell, M. J. et Spielman, A. (1999). Eastern equine encephalitis virus in birds: relative competence of European starlings (*Sturnus vulgaris*). *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 60(3):387–391.

- Komar, N., Langevin, S., Hinten, S., Nemeth, N., Edwards, E., Hettler, D., Davis, B., Bowen, R. et Bunning, M. (2003). Experimental infection of North American birds with the New York 1999 strain of West Nile virus. *Emerg. Infect. Dis.*, 9(3):311–322.
- Kostyukov, M. A. Alekseev, and A. N. Bul'chev, V. P. et Gordeeva, Z. E. (1986). Experimentally Proven Infection of *Culex pipiens* L. Mosquitoes with West Nile Fever Virus via the Lake Pallas *Rana ridibunda* Frog and its Transmission via Bites. *Med Parazitol (Mosk)*, 3:76–78.
- Kouzana, I. (2000). Étude épidémiologique et clinique de l'infection à West Nile dans la région de Mahdia. Thèse méd., Faculté de Médecine de Sousse.
- Kramer, L. D., Styer, L. M. et Ebel, G. D. (2008). A global perspective on the epidemiology of West Nile virus. *Annu. Rev. Entomol.*, 53:61–81.
- Krisztalovics, K., Ferenczi, E., Molnar, Z., Csohan, A., Ban, E., Zoldi, V. et Kaszas, K. (2008). West Nile virus infections in Hungary, August-September 2008. *Euro Surveill.*, 13(45):pii: 19030.
- Kuno, G. (2001). Persistence of arboviruses and antiviral antibodies in vertebrate hosts: its occurrence and impacts. *Rev. Med. Virol.*, 11(3):165–190.
- Kutasi, O., Bakonyi, T., Lecollinet, S., Biksi, I., Ferenczi, E., Bahuon, C., Sardi, S., Zientara, S. et Szenci, O. (2011). Equine encephalomyelitis outbreak caused by a genetic lineage 2 West Nile virus in Hungary. *J. Vet. Intern. Med.*, 25(3):586–591.
- Kwan, J. L., Kluh, S., Madon, M. B., Nguyen, D. V., Barker, C. M. et Reisen, W. K. (2010). Sentinel chicken seroconversions track tangential transmission of West Nile virus to humans in the greater Los Angeles area of California. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 83(5):1137–1145.
- Lanciotti, R. S., Ebel, G. D., Deubel, V., Kerst, A. J., Murri, S., Meyer, R., Bowen, M., McKinney, N., Morrill, W. E., Crabtree, M. B., Kramer, L. D. et Roehrig, J. T. (2002). Complete genome sequences and phylogenetic analysis of West Nile virus strains isolated from the United States, Europe, and the Middle East. *Virology*, 298(1):96–105.
- Lanciotti, R. S., Roehrig, J. T., Deubel, V., Smith, J., Parker, M., Steele, K., Crise, B., Volpe, K. E., Crabtree, M. B., Scherret, J. H., Hall, R. A., MacKenzie, J. S., Cropp, C. B., Panigrahy, B., Ostlund, E., Schmitt, B., Malkinson, M., Banet, C., Weissman, J., Komar, N., Savage, H. M., Stone, W., McNamara, T. et Gubler, D. J. (1999). Origin of the West Nile virus responsible

for an outbreak of encephalitis in the Northeastern United States. *Science*, 286(5448):2333–2337.

Langevin, S. A., Bunning, M., Davis, B. et Komar, N. (2001). Experimental infection of chickens as candidate sentinels for West Nile virus. *Emerg. Infect. Dis.*, 7(4):726–729.

Laurent-Rolle, M., Boer, E. F., Lubick, K. J., Wolfinbarger, J. B., Carmody, A. B., Rockx, B., Liu, W., Ashour, J., Shupert, W. L., Holbrook, M. R., Barrett, A. D., Mason, P. W., Bloom, M. E., García-Sastre, A., Khromykh, A. A. et Best, S. M. (2010). The NS5 protein of the virulent West Nile virus NY99 strain is a potent antagonist of type I interferon-mediated JAK-STAT signaling. *J Virol*, 84(7):3503–3515.

Lawrie, C. H., Uzcátegui, N. Y., Gould, E. A. et Nuttall, P. A. (2004). Ixodid and argasid tick species and west nile virus. *Emerg. Infect. Dis.*, 10(4):653–657.

Le Guenno, B., Bougermouh, A., Azzam, T. et Bouakaz, R. (1996). West Nile: a deadly virus? *Lancet*, 348(9037):1315.

Leblond, A., Hendriks, P. et Sabatier, P. (2007). West Nile virus outbreak detection using syndromic monitoring in horses. *Vector Borne Zoonotic Dis.*, 7(3):403–410.

Leblond, A., Zientara, S., Chadoeuf, J., Comby, N., Heng, M. et Sabatier, P. (2005). Prévalence de l'infection par le virus West Nile chez le cheval en Camargue. *Revue de Médecine Vétérinaire*, 156:77–84.

Lebreton, J.-D., Burnham, K. P., Clobert, J. et Anderson, D. R. (1992). Modeling survival and testing biological hypotheses using marked animals: a unified approach with case studies. *Ecol. Monogr.*, 62(1):67–118.

Lecollinet, S. (2011). Cours de virologie de S8. In *Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort*.

Ledermann, J. P., Lirono-Pino, M. A., Ellis, C., Saxton-Shaw, K. D., Blitvich, B. J., Beaty, B. J., Bowen, R. A. et Powers, A. M. (2011). Evaluation of widely used diagnostic tests to detect west nile virus infections in horses previously infected with st. louis encephalitis virus or dengue virus type 2. *Clin. Vaccine Immunol.*, 18(4):580–587.

Lesnoff, M. (2008). Evaluation of 12-month interval methods for estimating animal-times at risk in a traditional African livestock farming system. *Prev. Vet. Med.*, 85(1-2):9 – 16.

Lindenbach, B. D. et Rice, C. M. (2003). Molecular biology of flaviviruses. *Adv Virus Res*, 59:23–61.

- Linke, S., Niedrig, M., Kaiser, A., Ellerbrok, H., Müller, K., Müller, T., Conraths, F. J., Mühle, R.-U., Schmidt, D., Köppen, U., Bairlein, F., Berthold, P. et Pauli, G. (2007). Serologic evidence of West Nile virus infections in wild birds captured in Germany. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 77(2):358–364.
- Liu, W. J., Chen, H. B. et Khromykh, A. A. (2003). Molecular and functional analyses of Kunjin virus infectious cDNA clones demonstrate the essential roles for NS2A in virus assembly and for a nonconservative residue in NS3 in RNA replication. *J Virol*, 77(14):7804–7813.
- López, G., Jiménez-Clavero, M. A., Tejedor, C. G., Soriguer, R. et Figuerola, J. (2008). Prevalence of West Nile virus neutralizing antibodies in Spain is related to the behavior of migratory birds. *Vector Borne Zoonotic Dis.*, 8(5):615–621.
- Lucas, M., Frenkiel, M.-P., Mashimo, T., Guénet, J.-L., Deubel, V., Desprès, P. et Ceccaldi, P.-E. (2004). The Israeli strain IS-98-ST1 of West Nile virus as viral model for West Nile encephalitis in the Old World. *Viol. J.*, 1:9.
- Ludwig, A., Bicout, D. J., Chalvet-Monfray, K. et Sabatier, P. (2005). Modélisation de l'agressivité de *Culex modestus*, vecteur potentiel de West Nile en Camargue, en fonction de données météorologiques. *Environnement, Risques et Santé*, 4:1–5.
- Lukacik, G., Anand, M., Shusas, E. J., Howard, J. J., Oliver, J., Chen, H., Backenson, P. B., Kauffman, E. B., Bernard, K. A., Kramer, L. D. et White, D. J. (2006). West Nile virus surveillance in mosquitoes in New York State, 2000-2004. *J. Am. Mosq. Control Assoc.*, 22(2):264–271.
- Lvol, D. K. (1987). Natural foci of arboviruses in the USSR. *Sov Med Rev Virol*, 1:153–96.
- Lvov, D. K., Butenko, A. M., Gromashevsky, V. L., Kovtunov, A. I., Prilipov, A. G., Kinney, R., Aristova, V. A., Dzharkenov, A. F., Samokhvalov, E. I., Savage, H. M., Shchelkanov, M. Y., Galkina, I. V., Deryabin, P. G., Gubler, D. J., Kulikova, L. N., Alkhovsky, S. K., Moskvina, T. M., Zlobina, L. V., Sadykova, G. K., Shatalov, A. G., Lvov, D. N., Usachev, V. E. et Voronina, A. G. (2004). West Nile virus and other zoonotic viruses in Russia: examples of emerging-reemerging situations. *Arch. Virol. Suppl.*, (18):85–96.
- Mackenzie, J. M., Khromykh, A. A., Jones, M. K. et Westaway, E. G. (1998). Subcellular localization and some biochemical properties of the flavivirus Kunjin nonstructural proteins NS2A and NS4A. *Virology*, 245(2):203–215.

- Mackenzie, J. S. et Williams, D. T. (2009). The zoonotic flaviviruses of southern, south-eastern and eastern Asia, and Australasia: the potential for emergent viruses. *Zoonoses Public Health*, 56(6-7):338–356.
- Malkinson, M., Banet, C., Khinich, Y., Samina, I., Pokamunski, S. et Weisman, Y. (2001). Use of live and inactivated vaccines in the control of West Nile fever in domestic geese. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 951:255–261.
- Malkinson, M., Banet, C., Weisman, Y., Pokamunski, S., King, R., Drouet, M.-T. et Deubel, V. (2002). Introduction of West Nile virus in the Middle East by migrating white storks. *Emerg. Infect. Dis.*, 8(4):392–397.
- Martin, S.W., M. A. et Willeberg, P. (1987). *Veterinary epidemiology*. Iowa State University Press, Ames, Iowa, U.S.A.,.
- McGee, C. E., Schneider, B. S., Girard, Y. A., Vanlandingham, D. L. et Higgs, S. (2007). Nonviremic transmission of West Nile virus: evaluation of the effects of space, time, and mosquito species. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 76(3):424–430.
- McIntosh, B. M., Jupp, P. G., Dickinson, D. B., McGillivray, G. M. et Sweetnam, J. (1967). Ecological studies on Sindbis and West Nile viruses in South Africa. I. Viral activity as revealed by infection of mosquitoes and sentinel fowls. *S. Afr. J. Med. Sci.*, 32(1):1–14.
- Meece, J. K., Kronenwetter-Koepel, T. A., Vandermause, M. F. et Reed, K. D. (2006). West Nile virus infection in commercial waterfowl operation, Wisconsin. *Emerg. Infect. Dis.*, 12(9):1451–1453.
- Miller, B. R., Nasci, R. S., Godsey, M. S., Savage, H. M., Lutwama, J. J., Lanciotti, R. S. et Peters, C. J. (2000). First field evidence for natural vertical transmission of West Nile virus in *Culex univittatus* complex mosquitoes from Rift Valley province, Kenya. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 62(2):240–246.
- Mitchell, C. (1988). Occurrence, biology, and physiology of diapause in overwintering mosquitoes. In: *The Arboviruses: Epidemiology and Ecology*. Monath T.P. Atlanta, CRC Press Inc., pages 191–217.
- Molaei, G., Andreadis, T. G., Armstrong, P. M., Bueno, Jr, R., Dennett, J. A., Real, S. V., Sargent, C., Bala, A., Randle, Y., Guzman, H., Travassos da Rosa, A., Wuithiranyagool, T. et Tesh, R. B. (2007). Host feeding pattern of *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) and its role in transmission of West Nile virus in Harris County, Texas. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 77(1):73–81.

- Monaco, F., Lelli, R., Teodori, L., Pinoni, C., Di Gennaro, A., Polci, A., Calistri, P. et Savini, G. (2010). Re-emergence of West Nile virus in Italy. *Zoonoses Public Health*, 57(7-8):476–486.
- Monath, T. P., Sabattini, M. S., Pauli, R., Daffner, J. F., Mitchell, C. J., Bowen, G. S. et Cropp, C. B. (1985). Arbovirus investigations in Argentina, 1977-1980. IV. Serologic surveys and sentinel equine program. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 34(5):966–975.
- Morris, C. D., Baker, W. G., Stark, L., Burgess, J. et Lewis, A. L. (1994). Comparison of chickens and pheasants as sentinels for eastern equine encephalitis and St. Louis encephalitis viruses in Florida. *J. Am. Mosq. Control Assoc.*, 10(4):545–548.
- Moutou, F. (1997). Place des oiseaux sauvages en épidémiologie animale. In: Clergeau P. ed. Oiseaux à risques en ville et en campagne. *Paris INRA éditions*, 263-78.
- Moutou, F. (2001). Les migrations aviaires et le transport des agents infectieux. In: Cohen G. Mathiot C. and Le Minor L. eds. *La veille microbiologique*. Paris: Elsevier, 77-90.
- Mukhopadhyay, S., Kim, B.-S., Chipman, P. R., Rossmann, M. G. et Kuhn, R. J. (2003). Structure of West Nile virus. *Science*, 302(5643):248.
- Mumcuoglu, K. Y., Banet-Noach, C., Malkinson, M., Shalom, U. et Galun, R. (2005). Argasid ticks as possible vectors of West Nile virus in Israel. *Vector Borne Zoonotic Dis.*, 5(1):65–71.
- Murgue, B., Murri, S., Triki, H., Deubel, V. et Zeller, H. G. (2001a). West Nile in the Mediterranean basin: 1950-2000. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 951:117–126.
- Murgue, B., Murri, S., Zientara, S., Durand, B., Durand, J. P. et Zeller, H. (2001b). West Nile outbreak in horses in southern France, 2000: the return after 35 years. *Emerg. Infect. Dis.*, 7(4):692–696.
- Murphy, F. A., Fauquet, C. M., Bishop, D. H. L., Ghabrial, S. A., Jarvis, A. W., Martelli, G. P. et Mayo, M. A. (1995). Virus taxonomy, classification and nomenclature of viruses. *Arch. Virol.*, 10:1–586.
- Nasci, R. S., Savage, H. M., White, D. J., Miller, J. R., Cropp, B. C., Godsey, M. S., Kerst, A. J., Bennett, P., Gottfried, K. et Lanciotti, R. S. (2000). West Nile virus in overwintering Culex mosquitoes, New York City,. *Emerg. Infect. Dis.*, 7(4):742–744.
- National Health Authorities of Tunisia (2011). West Nile virus - Greece, Tunisia. *EpiSouth Weekly Epi Bulletin*, 2011(189):2.

- Nicolescu, G., Purcarera Ciulacu, V. et Prioteasa, L. (2009). West Nile virus in Romania. Rapport technique, Report to EDEN annual meeting.
- Nikolay, B., Diallo, M., Boye, C. S. B. et Sall, A. A. (2011). Usutu virus in Africa. *Vector Borne Zoonotic Dis.*, 11(11):1417–1423.
- Nir, Y., Avivi, A., Lasovski, Y., Margalit, J. et Goldwasser, R. (1972). Arbovirus activity in Israel. *Isr. J. Med. Sci.*, 8(10):1695–1701.
- Nuttall, P. (1997). Viruses, bacteria, and fungi of birds. In: Clayton D.H. and Moore J. eds. Host-parasite evolution: general principles and avian models. *Oxford: Oxford University Press*, pages 271–302.
- Oliphant, T., Engle, M., Nybakken, G. E., Doane, C., Johnson, S., Huang, L., Gorlatov, S., Mehlhop, E., Marri, A., Chung, K. M., Ebel, G. D., Kramer, L. D., Fremont, D. H. et Diamond, M. S. (2005). Development of a humanized monoclonal antibody with therapeutic potential against West Nile virus. *Nat. Med.*, 11(5):522–530.
- Olsen, B., Munster, V., Wallensten, A., Waldenström, J. et Osterhaus, A. (2006). Global patterns of Influenza A virus in wild birds. *Science*, 312:384–8.
- Otte, M. J. et Gumm, I. D. (1997). Intra-cluster correlation coefficients of 20 infections calculated from the results of cluster-sample surveys. *Prev. Vet. Med.*, 31(1-2):147–150.
- Ozkul, A., Yildirim, Y., Pinar, D., Akcali, A., Yilmaz, V. et Colak, D. (2006). Serological evidence of West Nile Virus (WNV) in mammalian species in Turkey. *Epidemiol. Infect.*, 134(4):826–829.
- Papa, A. et al (2010). Ongoing outbreak of West Nile virus infections in humans in Greece, July - August 2010. *Euro Surveill.*, 15(34):pii=19644.
- Parks, J. J., Ganaway, J. R. et Price, W. H. (1958). Studies on immunologic overlap among certain arthropod-borne viruses. III. A laboratory analysis of three strains of West Nile virus which have been studied in human cancer patients. *Am. J. Hyg.*, 68(2):106–119.
- Parreira, R., Severino, P., Freitas, F., Piedade, J., Almeida, A. P. G. et Esteves, A. (2007). Two distinct introductions of the West Nile virus in Portugal disclosed by phylogenetic analysis of genomic sequences. *Vector Borne Zoonotic Dis.*, 7(3):344–352.
- Paute, M. E. (2008). Tunisie géographie et territoire wat work shop atelier territoire Mahdia. Rapport technique.

- Perra, A., Zientara, S., Murgue, B., Zeller, H., Hars, J., Mathieu, B., Lagneau, C., Gloaguen, C., Thill, E., Durand, J., De Lamballerie, X., Charrel, R., Armengaud, A., Pradel, V., Capek, I. et Dufour, B. (2002). La surveillance du virus West Nile en France en 2001. *Bull. Epidémiol. Hebd.*, 33:161–163.
- Petersen, L. R. et Roehrig, J. T. (2001). West Nile virus: a reemerging global pathogen. *Emerg. Infect. Dis.*, 7(4):611–614.
- Philip, C. et Smadel, J. (1943). Transmission of West Nile virus by infected *Aedes albopictus*. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 48:537–48.
- Pilo-Moron, E., Vincent, J. et Le Corroller, Y. (1970). Isolation of a West-Nile virus in the extreme south of the Algerian Sahara (Djanet). *Arch. Inst. Pasteur Alger.*, 48:181–184.
- Pinger, R. R., Rowley, W. A., Wong, Y. W. et Dorsey, D. C. (1975). Trivittatus virus infections in wild mammals and sentinel rabbits in central Iowa. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 24(6 Pt 1):1006–1009.
- Platonov, A. E., Shipulin, G. A., Shipulina, O. Y., Tyutyunnik, E. N., Frolochkina, T. I., Lanciotti, R. S., Yazyshina, S., Platonova, O. V., Obukhov, I. L., Zhukov, A. N., Vengerov, Y. Y. et Pokrovskii, V. I. (2001). Outbreak of West Nile virus infection, Volgograd Region, Russia, 1999. *Emerg. Infect. Dis.*, 7(1):128–132.
- Pruzanski, W. et Altman, R. (1962). Encephalitis due to West Nile fever virus. *World Neurol*, 3:524–528.
- Purse, B. V., Mellor, P. S., Rogers, D. J., Samuel, A. R., Mertens, P. P. C. et Baylis, M. (2005). Climate change and the recent emergence of bluetongue in Europe. *Nat. Rev. Microbiol.*, 3(2):171–181.
- Pybus, O. G. et Rambaut, A. (2009). Evolutionary analysis of the dynamics of viral infectious disease. *Nat. Rev. Genet.*, 10(8):540–550.
- R Core Team (2012). *R: A Language and Environment for Statistical Computing*. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0.
- Randolph, S. E. et Rogers, D. J. (2010). The arrival, establishment and spread of exotic diseases: patterns and predictions. *Nat. Rev. Microbiol.*, 8:361–371.
- Rappole, J. H., Derrickson, S. R. et Hubálek, Z. (2000). Migratory birds and spread of West Nile virus in the Western Hemisphere. *Emerg. Infect. Dis.*, 6(4):319–328.

- Rappole, J. H. et Hubálek, Z. (2003). Migratory birds and west nile virus. *J. Appl. Microbiol.*, 94 Suppl:47S–58S.
- Read, R. W., Rodriguez, D. B. et Summers, B. A. (2005). West Nile virus encephalitis in a dog. *Vet. Pathol.*, 42(2):219–222.
- Reisen, W. K., Fang, Y., Lothrop, H. D., Martinez, V. M., Wilson, J., Oconnor, P., Carney, R., Cahoon-Young, B., Shafii, M. et Brault, A. C. (2006a). Overwintering of West Nile virus in Southern California. *J. Med. Entomol.*, 43(2):344–355.
- Reisen, W. K., Fang, Y. et Martinez, V. M. (2006b). Effects of temperature on the transmission of west nile virus by *Culex tarsalis* (Diptera: Culicidae). *J. Med. Entomol.*, 43(2):309–317.
- Reisen, W. K., Hardy, J. L. et Presser, S. B. (1992). Evaluation of domestic pigeons as sentinels for detecting arbovirus activity in southern California. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 46(1):69–79.
- Reisen, W. K. et Milby, M. M. (1987). Studies on autogeny in *Culex tarsalis*: 3. Life table attributes of autogenous and anautogenous strains under laboratory conditions. *J. Am. Mosq. Control Assoc.*, 3(4):619–625.
- Resnick, M. P., Grunenwald, P., Blackmar, D., Hailey, C., Bueno, R. et Murray, K. O. (2008a). Juvenile dogs as potential sentinels for West Nile virus surveillance. *Zoonoses Public Health*, 55(8-10):443–447.
- Resnick, M. P., Grunenwald, P., Blackmar, D., Hailey, C., Bueno, R. et Murray, K. O. (2008b). Juvenile dogs as potential sentinels for West Nile virus surveillance. *Zoonoses Public Health*, 55(8-10):443–447.
- Resnick, M. P., Grunenwald, P., Blackmar, D., Hailey, C., Bueno, R. et Murray, K. O. (2008c). Juvenile dogs as potential sentinels for West Nile virus surveillance. *Zoonoses Public Health*, 55(8-10):443–447.
- Rizzoli, A., Rosà, R., Rosso, F., Buckley, A. et Gould, E. (2007). West Nile virus circulation detected in northern Italy in sentinel chickens. *Vector Borne Zoonotic Dis.*, 7(3):411–417.
- Rodhain, F. et Perez, C. (1985). *Précis d'entomologie médicale et vétérinaire*. Paris,.
- Rodhain F., a. P. C. (1985). *Précis d'entomologie médicale et vétérinaire*. Paris: Maloine SA éditeur.

- Romi, R., Pontuale, G., Ciufolini, M. G., Fiorentini, G., Marchi, A., Nicoletti, L., Cocchi, M. et Tamburro, A. (2004). Potential vectors of West Nile virus following an equine disease outbreak in Italy. *Med. Vet. Entomol.*, 18(1):14–19.
- Rossini, G., Cavrini, F. et Pierro, A. (2008). First human case of West Nile virus neuroinvasive infection in Italy. Rapport technique, case report. *Eur Surveill* September.
- Saito, M., Osa, Y. et Asakawa, M. (2009a). Antibodies to flaviviruses in wild ducks captured in Hokkaido, Japan: risk assessment of invasive flaviviruses. *Vector Borne Zoonotic Dis.*, 9(3):253–258.
- Saito, M., Osa, Y. et Asakawa, M. (2009b). Antibodies to flaviviruses in wild ducks captured in Hokkaido, Japan: risk assessment of invasive flaviviruses. *Vector Borne Zoonotic Dis.*, 9(3):253–258.
- Samuel, M. A. et Diamond, M. S. (2006). Pathogenesis of West Nile Virus Infection: a Balance between Virulence, Innate and Adaptive Immunity, and Viral Evasion. *J. Virol.*, 80:no.19 9349–9360.
- Sanchez, M. D., Pierson, T. C., Degrace, M. M., Mattei, L. M., Hanna, S. L., Del Piero, F. et Doms, R. W. (2007). The neutralizing antibody response against West Nile virus in naturally infected horses. *Virology*, 359(2):336–348.
- Savage, H. M., Ceianu, C., Nicolescu, G., Karabatsos, N., Lanciotti, R., Vladimirescu, A., Laiv, L., Ungureanu, A., Romanca, C. et Tsai, T. F. (1999). Entomologic and avian investigations of an epidemic of West Nile fever in Romania in 1996, with serologic and molecular characterization of a virus isolate from mosquitoes. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 61(4):600–611.
- Savini, G., Monaco, F., Calistri, P. et Lelli, R. (2008). Phylogenetic analysis of West Nile virus isolated in Italy in 2008. *Euro Surveill.*, 13(48).
- Savini, G., Monaco, F., Terregino, C., Di Gennaro, A., Bano, L., Pinoni, C., De Nardi, R., Bonilauri, P., Pecorari, M., Di Gialleonardo, L., Bonfanti, L., Polci, A., Calistri, P. et Lelli, R. (2011). Usutu virus in Italy: an emergence or a silent infection? *Vet Microbiol*, 151(3-4):264–274.
- Scaramozzino, N. et Crance, J. (2002). Les protéases virales dans la famille des Flaviviridae. *Virologie*, 6:Numéro 6, 445–54.

- Scharlemann, J. P. W., Benz, D., Hay, S. I., Purse, B. V., Tatem, A. J., Wint, G. R. W. et Rogers, D. J. (2008). Global data for ecology and epidemiology: a novel algorithm for temporal Fourier processing MODIS Data. *PLoS ONE*, 3(1):e1408.
- Schmidt, J. R. et Said, M. I. (1964). Isolation of West Nile virus from the African bird argasid, *Argas reflexus hermanni*, in Egypt. *J. Med. Entomol.*, 1:83–86.
- Schuffenecker, I., Peyrefitte, C. N., el Harrak, M., Murri, S., Leblond, A. et Zeller, H. G. (2005). West Nile virus in Morocco, 2003. *Emerg. Infect. Dis.*, 11(2):306–309.
- Seidowski, D., Ziegler, U., von Rönn, J. A. C., Müller, K., Hüppop, K., Müller, T., Freuling, C., Mühle, R.-U., Nowotny, N., Ulrich, R. G., Niedrig, M. et Groschup, M. H. (2010). West Nile virus monitoring of migratory and resident birds in Germany. *Vector Borne Zoonotic Dis.*, 10(7):639–647.
- Shirafuji, H., Kanehira, K., Kubo, M., Shibahara, T. et Kamio, T. (2009). Experimental West Nile virus infection in aigamo ducks, a cross between wild ducks (*Anas platyrhynchos*) and domestic ducks (*Anas platyrhynchos* var. *domesticus*). *Avian Dis.*, 53(2):239–244.
- Sirbu, A., Ceianu, C., Panculescu-Gatej, R., Vázquez, A., Tenorio, A., Rebreanu, R., Niedrig, M., Nicolescu, G. et Pistol, A. (2011). Outbreak of West Nile virus infection in humans, Romania, July to October 2010. *Euro Surveill.*, 16(2):pii=19762.
- Soliman, A., Mohareb, E., Salman, D., Saad, M., Salama, S., Fayez, C., Hanafi, H., Medhat, I., Labib, E., Rakha, M., El-Sayed, N., Yingst, S., Tjaden, J. et Earhart, K. (2010). Studies on West Nile virus infection in Egypt. *J. Infect. Public Health*, 3(2):54–59.
- Sørensen, R., Zinko, U. et Seibert, J. (2006). On the calculation of the topographic wetness index: evaluation of different methods based on field observations. *Hydrology and Earth System Sciences*, 10(1):101–112.
- Sotelo, E., Fernández-Pinero, J., Llorente, F., Vázquez, A., Moreno, A., Agüero, M., Cordioli, P., Tenorio, A. et Jiménez-Clavero, M. Á. (2011). Phylogenetic relationships of Western Mediterranean West Nile virus strains (1996-2010) using full-length genome sequences: single or multiple introductions? *J. Gen. Virol.*, 92(Pt 11):2512–2522.
- Spielman, A., Andreadis, T. G., Apperson, C. S., Cornel, A. J., Day, J. F., Edman, J. D., Fish, D., Harrington, L. C., Kiszewski, A. E., Lampman, R., Lanzaro, G. C., Matuschka, F.-R., Munstermann, L. E., Nasci, R. S., Norris, D. E., Novak, R. J., Pollack, R. J., Reisen, W. K., Reiter, P., Savage, H. M., Tabachnick, W. J. et Wesson, D. M. (2004). Outbreak of West Nile virus in North America. *Science*, 306(5701):1473–5; author reply 1473–5.

- Stadler, K., Allison, S. L., Schalich, J. et Heinz, F. X. (1997). Proteolytic activation of tick-borne encephalitis virus by furin. *J. Virol.*, 71(11):8475–8481.
- Steinman, A., Banet-Noach, C., Simanov, L., Grinfeld, N., Aizenberg, Z., Levi, O., Lahav, D., Malkinson, M., Perk, S. et Shpigel, N. Y. (2006). Experimental infection of common garter snakes (*Thamnophis sirtalis*) with West Nile virus. *Vector Borne Zoonotic Dis.*, 6(4):361–368.
- Swaddle, J. P. et Calos, S. E. (2008). Increased avian diversity is associated with lower incidence of human West Nile infection: observation of the dilution effect. *PLoS One*, 3(6):e2488.
- Takeda, T., Ito, T., Chiba, M., Takahashi, K., Niioka, T. et Takashima, I. (1998). Isolation of tick-borne encephalitis virus from *Ixodes ovatus* (Acari: Ixodidae) in Japan. *J. Med. Entomol.*, 35(3):227–231.
- Taylor, R., Work, T. et Hurlbut, H. S., a. R. F. A. (1956). study of the ecology of West Nile virus in Egypt. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 5:579–620.
- Tber, A. (1996). West Nile fever in horses in Morocco. *Bull OIE*, 108:867–9.
- Teehee, M. L., Bunning, M. L., Stevens, S. et Bowen, R. A. (2005). Experimental infection of pigs with West Nile virus. *Arch. Virol.*, 150(6):1249–1256.
- Tempelis, C., Francy, D., Hayes, R. et Lofy, M. (1967). Variations in feeding patterns of seven culicine mosquitoes on vertebrate hosts in Weld and Larimer Counties, Colorado. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 16:(1) : 111–9.
- Ternovoi, V. A., Protopopova, E. V., Surmach, S. G., Gazetdinov, M. V., Zolotykh, S. I., Shestopalov, A. M., Pavlenko, E. V., Leonova, G. N. et Loktev, V. B. (2006). The genotyping of the West Nile virus in birds in the far eastern region of Russia in 2002-2004. *Mol. Gen. Mikrobiol. Virusol.*, (4):30–35.
- Tiawsirisup, S., Platt, K. B., Tucker, B. J. et Rowley, W. A. (2005). Eastern cottontail rabbits (*Sylvilagus floridanus*) develop West Nile virus viremias sufficient for infecting select mosquito species. *Vector Borne Zoonotic Dis.*, 5(4):342–350.
- Toma, B. (2009). Les animaux sentinelles. *Epidémiol. Santé anim.*, 56:5–14.
- Toma, B., Dufour, B., Sanaa, M., Benet, J., Shaw, A., Moutou, F. et Louza, A. (2001). Epidémiologie appliquée à la lutte collective contre les maladies animales transmissibles majeures. *Maisons-Alfort (France) : AEEMA*, 2^{de} édition:696.

- Triki, H., Murri, S., Le Guenno, B., Bahri, O., Hili, K., Sidhom, M. et Dellagi, K. (2001). Méningo-encéphalite à arbovirus West Nile en Tunisie [West Nile viral meningo-encephalitis in Tunisia]. *Med. Trop.*, 61(6):487–490.
- Tsai, T. F., Popovici, F., Cernescu, C., Campbell, G. L. et Nedelcu, N. I. (1998). West Nile encephalitis epidemic in southeastern Romania. *Lancet*, 352(9130):767–771.
- Turell, M. J., Dohm, D. J., Sardelis, M. R., Oguinn, M. L., Andreadis, T. G. et Blow, J. A. (2005). An update on the potential of north American mosquitoes (Diptera: Culicidae) to transmit West Nile Virus. *J. Med. Entomol.*, 42(1):57–62.
- Valiakos, G. et al (May 2011). Molecular detection and phylogenetic analysis of West Nile virus lineage 2 in sedentary wild birds (Eurasian magpie), Greece, 2010. *Euro Surveillance*.
- Van der Meulen, K. M., Pensaert, M. B. et Nauwynck, H. J. (2005). West Nile virus in the vertebrate world. *Arch. Virol.*, 150(4):637–657.
- Vandaële, E. (2009). Le premier vaccin contre la maladie de West Nile en Europe. *Le Point Vétérinaire*, 296:20–21.
- Vazquez, A., Sanchez-Seco, M. P., Ruiz, S., Molero, F., Hernandez, L., Moreno, J., Magallanes, A., Tejedor, C. G. et Tenorio, A. (2010). Putative new lineage of west nile virus, Spain. *Emerg. Infect. Dis.*, 16(3):549–552.
- Venter, M., Human, S., Zaayman, D., Gerdes, G. H., Williams, J., Steyl, J., Leman, P. A., Paweska, J. T., Setzkorn, H., Rous, G., Murray, S., Parker, R., Donnellan, C. et Swanepoel, R. (2009). Lineage 2 West Nile virus as cause of fatal neurologic disease in horses, South Africa. *Emerg. Infect. Dis.*, 15(6):877–884.
- Venter, M. et Swanepoel, R. (2010). West Nile virus lineage 2 as a cause of zoonotic neurological disease in humans and horses in southern Africa. *Vector Borne Zoonotic Dis.*, 10(7):659–664.
- Ventura, A. K. et Ehrenkranz, N. J. (1975). Detection of Venezuelan equine encephalitis virus in rural communities of Southern Florida by exposure of sentinel hamsters. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 24(4):715–717.
- Vermeil, C., Lavillaureix, J. et E., R. (1960). Sur la conservation et la transmission du virus West Nile par des arthropodes. *Bull. Soc. Pathol. Exot.*, 53:273–279.

- Versteirt, V., Schaffner, F., Garros, C., Dekoninck, W., Coosemans, M. et Van Bortel, W. (2009). Introduction and establishment of the exotic mosquito species *Aedes japonicus japonicus* (Diptera: Culicidae) in Belgium. *J. Med. Entomol.*, 46(6):1464–1467.
- Vinogradova, E. (2000). *Culex pipiens pipiens* mosquitoes: taxonomy, distribution, ecology, physiology, genetics, applied importance and control. *Sofia-Moscow, PENSOFT Publishers.*, page 250.
- Walendström, J., Broman, T., Carlsson, I., Hasselquist, D. et al (2002). Prevalence of *Campylobacter lari* and *Campylobacter coli* in different ecological guilds and taxa of migrating birds. *Appl. Environ. Microbiol.*, 68:5911–7.
- Weinberger, M., Pitlik, S. D., Gandacu, D., Lang, R., Nassar, F., Ben David, D., Rubinstein, E., Izthaki, A., Mishal, J., Kitzes, R., Siegman-Igra, Y., Giladi, M., Pick, N., Mendelson, E., Bin, H. et Shohat, T. (2001). West Nile fever outbreak, Israel, 2000: epidemiologic aspects. *Emerg. Infect. Dis.*, 7(4):686–691.
- Weiss, D., Carr, D., Kellachan, J., Tan, C., Phillips, M., Bresnitz, E., Layton, M. et al, W. N. V. O. R. W. G. (2001). Clinical findings of West Nile virus infection in hospitalized patients, New York and New Jersey, 2000. *Emerg. Infect. Dis.*, 7(4):654–658.
- Weissenböck, H., Kolodziejek, J., Url, A., Lussy, H., Rebel-Bauder, B. et Nowotny, N. (2002). Emergence of Usutu virus, an African mosquito-borne flavivirus of the Japanese encephalitis virus group, central Europe. *Emerg. Infect. Dis.*, 8(7):652–656.
- Whitman, L. et Aitken, T. H. (1960). Potentiality of *Ornithodoros moubata* Murray (Acarina, Argasidae) as a reservoir vector of West Nile virus. *Ann. Trop. Med. Parasitol.*, 54:192–204.
- Williams, J. E., Young, O. P., Watts, D. M. et Reed, T. J. (1971). Wild birds as eastern (EEE) and western (WEE) equine encephalitis sentinels. *J. Wildl. Dis.*, 7(3):188–194.
- Wojnarowicz, C., Olkowski, A. et Schwan-Lardner, K. (2007). First Canadian outbreak of West Nile virus disease in farmed domestic ducks in Saskatchewan. *Can. Vet. J.*, 48(12):1270–1271.
- Xiao, S. Y., Guzman, H., Zhang, H., Travassos da Rosa, A. P. et Tesh, R. B. (2001). West Nile virus infection in the golden hamster (*Mesocricetus auratus*): a model for West Nile encephalitis. *Emerg. Infect. Dis.*, 7(4):714–721.
- Yang, J.-S., Ramanathan, M. P., Muthumani, K., Choo, A. Y., Jin, S.-H., Yu, Q.-C., Hwang, D. S., Choo, D. K., Lee, M. D., Dang, K., Tang, W., Kim, J. J. et Weiner, D. B. (2002). Induction of

inflammation by West Nile virus capsid through the caspase-9 apoptotic pathway. *Emerg. Infect. Dis.*, 8(12):1379–1384.

Yeh, J.-Y., Park, J.-Y. et Ostlund, E. N. (2011). Serologic evidence of West Nile Virus in wild ducks captured in major inland resting sites for migratory waterfowl in South Korea. *Vet. Microbiol.*, 154(1-2):96–103.

Zehender, G., Ebranati, E., Bernini, F., Lo Presti, A., Rezza, G., Delogu, M., Galli, M. et Ciccozzi, M. (2011). Phylogeography and epidemiological history of West Nile virus genotype 1a in Europe and the Mediterranean basin. *Infect. Genet. Evol.*, 11(3):646–653.

Zeller, H. et Murgue, B. (2001). Rôle des oiseaux migrants dans l'épidémiologie du virus West Nile. *Med. Mal. Infect.*, 31, Supplement 2:168–174.

Zeller, H. et Schuffenecker, I. (2004). West Nile virus: an overview of its spread in Europe and the Mediterranean basin in contrast to its spread in the Americas. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.*, 23(3):147–156.

Zhang, Y., Corver, J., Chipman, P. R., Zhang, W., Pletnev, S. V., Sedlak, D., Baker, T. S., Strauss, J. H., Kuhn, R. J. et Rossmann, M. G. (2003). Structures of immature flavivirus particles. *EMBO J.*, 22(11):2604–2613.

Ziegler, U., Angenvoort, J., Fischer, D., Fast, C., Eiden, M., Rodriguez, A. V., Revilla-Fernández, S., Nowotny, N., de la Fuente, J. G., Lierz, M. et Groschup, M. H. (2012). Pathogenesis of West Nile virus lineage 1 and 2 in experimentally infected large falcons. *Vet. Microbiol.*

Zientara, S. (2002). Infection a virus West Nile, situation épidémiologique, risques pour l'Homme et epizootie en France (2000-2001). *Bull. Acad. Vét. France*, 155:67–72.

Zientara, S. et Lecollinet, S. (2010). Le virus West Nile, sa diffusion limitée en Europe par comparaison avec sa rapide implantation en Amérique du Nord, Les maladies infectieuses exotiques : risque d'importation et d'exportation en Europe. *Rapports de l'académie de médecine, Publications Médecine Science, Flammarion*, pages 179–193.

Zou, G., Puig-Basagoiti, F., Zhang, B., Qing, M., Chen, L., Pankiewicz, K. W., Felczak, K., Yuan, Z. et Shi, P.-Y. (2009). A single-amino acid substitution in West Nile virus 2K peptide between NS4A and NS4B confers resistance to lycorine, a flavivirus inhibitor. *Virology*, 384(1):242–252.

